



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Departamento de Química Orgánica**

**Nuevos copolímeros con carácter catiónico con  
aplicaciones en terapia génica**

Juan Alfonso Redondo Marín

**Memoria presentada para optar al grado de doctor en  
Química Orgánica**

**Dirigida por:**

Carlos Elvira Pujalte  
Alberto Gallardo Ruíz  
Helmut Reinecke

**Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros  
(ICTP, CSIC)**

Madrid, 2013



## Abreviaturas



## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>CDS<sub>t</sub></b>	Monómero estirénico derivado de la $\beta$ -ciclodextrina
<b>EPA</b>	Metacrilamida de <i>N</i> -(2-aminoetil pirrolidina)
<b>GLCS<sub>t</sub></b>	Monómero estirénico derivado de la $\alpha$ -glucosa
<b>HPMA</b>	Metacrilamida de <i>N</i> -(2-hidroxipropilo)
<b>LCST</b>	<i>Lower critical solution temperature</i>
<b>MCDSt</b>	Monómero estirénico derivado de la forma permetilada de $\beta$ -ciclodextrina
<b>MGLCS<sub>t</sub></b>	Monómero estirénico derivado de la forma permetilada de $\alpha$ -glucosa
<b>PEI</b>	Polietilenimina
<b>PLL</b>	poli(L-lisina)
<b>Ta</b>	Metacrilato de 2-(3-(Bis(2-(dietilamino)etil)amino)propanamido)etilo, monómero metacrílico no hidrolizable derivado de TEDETA
<b>Te</b>	Metacrilato de 2-((3-(Bis(2-(dietilamino)etil)amino)propanoil)oxi)etilo, monómero metacrílico hidrolizable derivado de TEDETA
<b>TEDETA</b>	N,N,N',N'-tetraetildietilentriamina



# Índice





**Índice****Abreviaturas**

<b>1. Introducción General</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Diseño propuesto en este trabajo</b>	<b>8</b>
<b>1.2. Hipótesis y objetivos de esta tesis</b>	<b>15</b>
<b>1.3. Bibliografía</b>	<b>16</b>
<b>2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Introducción</b>	<b>23</b>
2.1.1. Copolimerización radical	26
<b>2.2. Materiales y métodos</b>	<b>31</b>
2.2.1. Reactivos	31
2.2.2. Síntesis de intermedios y monómeros	32
2.2.3. Polimerizaciones	36
2.2.4. Métodos	37
<b>2.3. Resultados y discusión</b>	<b>38</b>
2.3.1. Síntesis de monómeros	38
2.3.2. Síntesis y caracterización de copolímeros con HPMA	41
2.3.2.1. Estudio del carácter hidrolizable de poli(Te-co-HPMA)	49
2.3.2.2. Termosensibilidad de los derivados de Ta y Te	51
2.3.3. Síntesis y caracterización de copolímeros de EPA con las unidades glucosídicas	53
<b>2.4. Bibliografía</b>	<b>60</b>

<b>3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección</b>	<b>65</b>
<b>3.1. Introducción</b>	<b>65</b>
<b>3.2. Materiales y métodos</b>	<b>70</b>
3.2.1. Reactivos	70
3.2.2. Síntesis del monómero fluorescente NBDM	71
3.2.3. Formación y caracterización de los complejos polielectrolíticos polímero/ADN	71
3.2.4. Respuesta celular con HPMA. Transfección y citocompatibilidad	73
3.2.4.1. Eficiencia en transfección y actividad metabólica <i>in vitro</i> de los polímeros derivados de EPA y HPMA	73
3.2.4.2. Eficiencia en transfección y citocompatibilidad <i>in vitro</i> de los polímeros derivados de Ta, Te y HPMA	74
3.2.5. Respuesta celular con los monómeros derivados de EPA, $\alpha$ - glucosa y $\beta$ -ciclodextrina. Determinación de su eficiencia de transfección y citocompatibilidad <i>in vitro</i>	75
<b>3.3. Resultados y discusión</b>	<b>76</b>
3.3.1. Copolímeros con HPMA	76
3.3.1.1. Polímeros derivados de EPA y HPMA	77
3.3.1.2. Polímeros derivados de Ta y HPMA y de Te y HPMA	83
3.3.1.3. Análisis conjunto de los sistemas EPA-HPMA y Ta- HPMA	89
3.3.2. Copolímeros glucosídicos	91
3.3.2.1 Copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt)	92
3.3.2.2 Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt)	99
3.3.2.3 Copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt)	104

	Índice
3.3.2.4. Análisis conjunto de los copolímeros glucosídicos	110
3.3.3. Ensayo preliminar de transfección con derivados fluorescentes de los polímeros glucosídicos	116
<b>3.4. Bibliografía</b>	119
<b>4. Conclusiones</b>	123
<b>Anexo</b>	127
A.1. Síntesis del monómero estirénico derivado de $\beta$ -CD (CDSt)	127
A.2. Síntesis del monómero estirénico derivado de la forma permetilada de $\beta$ -CD (MCDSt)	130
A.3. Síntesis del monómero estirénico derivado de $\alpha$ -glucosa (GLCSt)	132
A.4. Síntesis del monómero MGLCSt mediante permetilación del monómero GLCSt	134
B. Espectros de RMN- $^1\text{H}$ de los monómeros sintetizados y caracterizados en este trabajo	135
<b>Índice de figuras</b>	143
<b>Índice de tablas</b>	153



# **1.Introducción general**



### 1. Introducción general

La terapia génica está recibiendo una creciente atención durante los últimos años en el campo de la medicina y la biotecnología debido al gran potencial que posee para tratar enfermedades crónicas y desórdenes genéticos como son la fibrosis cística, hemofilia, cáncer, etc. En un principio fue definida como una tecnología que permite la sustitución de un gen mutado por copias normales en las células diana para la producción de proteínas terapéuticas necesarias para la normalización de los procesos celulares. Sin embargo, debido a los avances logrados en los últimos años en este campo, la terapia génica es ahora definida como la transferencia de material genético, ya sea ADN o ARN, con el objetivo de tratar o prevenir una enfermedad<sup>1</sup>.

Para llevar a cabo este proceso se necesita una copia funcional del gen que codifica la proteína terapéutica, es decir, la proteína cuya expresión nos permitirá recuperar la función normal del órgano o tejido tratado. Además, la expresión de este gen debe estar regulada, lo que se consigue, en la mayoría de los casos, mediante su integración dentro de un plásmido, un ADN circular de doble hélice con capacidad de autorreplicarse, bajo el control de un promotor que regule su expresión.

Finalmente, en muchos casos es también necesario un 'vector'. Los vectores o sistemas de vehiculización de ADN en estos procedimientos deben ser diseñados para proteger el material genético de una degradación en el medio intra y extracelular, con el objetivo de lograr una transfección eficiente de éstos en las células diana con la consiguiente expresión de las proteínas deseadas. Además de proteger el gen, el vector debe neutralizar la carga negativa de la cadena de ADN para evitar la repulsión electrostática con la superficie de la célula diana y condensar la estructura voluminosa del ADN a la escala adecuada para su internalización<sup>2-4</sup>.

La manipulación genética se puede realizar a través de dos procesos: *ex vivo* o *in vivo*. En el proceso *ex vivo* se aíslan células sanas del paciente o donante, que son transfectadas mediante su cultivo en presencia del plásmido. Una vez seleccionadas las células que han sido transfectadas, éstas son transplantadas de nuevo al paciente. Para la liberación genética *ex vivo* se utilizan vectores, pero también diversas técnicas mecánicas que sólo necesitan ADN (sin vector), tales como la utilización de presión hidrostática, electroporación, infusión continua y sonicación. Estas técnicas mecánicas proveen una alta eficiencia de transfección genética relativa *ex vivo*; sin embargo, estos procedimientos son costosos y no son adecuados para todas las situaciones ni para el procedimiento *in vivo* ya que la integridad de las membranas de las células podrían verse seriamente afectadas. Además, estas técnicas pueden requerir que los tejidos diana estén expuestos quirúrgicamente durante el proceso de transfección<sup>5-10</sup>.

## 1. Introducción general

Todos los sistemas desarrollados de la presente tesis doctoral están orientados para su utilización como vectores en terapia génica *in vivo*, donde dicho sistema transportador con el ADN es directamente introducido en el paciente, en el tejido diana o lo más cerca posible de éste. En esta vía *in vivo* debemos tener en cuenta, además de las condiciones existentes en el medio intracelular, las condiciones existentes en el medio extracelular, como por ejemplo, el torrente sanguíneo, ya que nuestro gen terapéutico debe llegar a través de él hasta el tejido diana donde queremos que sea expresado.

Un tipo de vector de gran relevancia es el viral; los virus son transportadores de ADN muy potentes debido a que tras millones de años de evolución han desarrollado una maquinaria específica para liberar material genético en las células. El primer ejemplo del uso de vectores virales en terapia génica se remonta a 1990, cuando una paciente de 4 años fue tratada de una deficiencia de la enzima adenosina desaminasa, que le provocó una severa inmunodeficiencia. Para el tratamiento se utilizó un retrovirus que codificaba una copia funcional del enzima, con el que se transfectaron sus células T, restableciendo la funcionalidad normal de su sistema inmunitario de forma temporal. Sin embargo, a pesar de los grandes resultados obtenidos en los últimos años, los vectores virales presentan ciertas desventajas. Una de las más estudiadas es la posibilidad de mutagénesis insercional, que puede producirse cuando el material genético se inserta de forma aleatoria en el genoma del individuo, alterando la expresión normal de algún gen. En la bibliografía se han reportado numerosos casos de leucemia provocada por este tipo de tratamientos, además de varios casos de muerte debido a una respuesta inmunitaria frente al vector viral<sup>11</sup>.

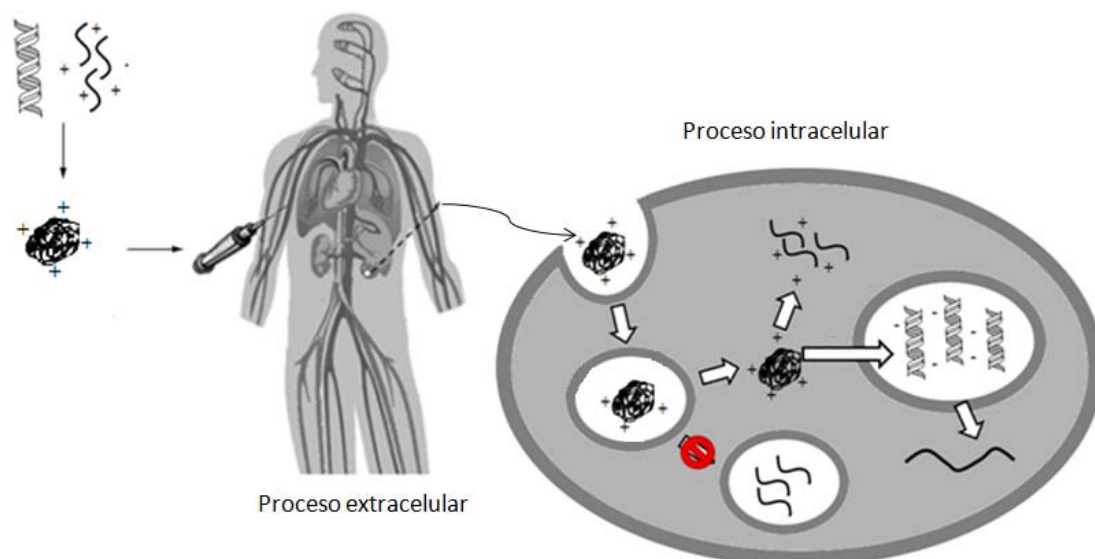
Debido a todos estos problemas, a partir de los años 90, se ha estado trabajando de forma intensa en el desarrollo de vectores no virales para terapia génica. Los vectores no virales están basados mayoritariamente en moléculas de naturaleza catiónica, polímeros, péptidos y lípidos, que forman complejos polielectrolíticos con los ácidos nucleicos, que presentan carga neta negativa. Entre ellos destacan principalmente los polímeros, ya que presentan ciertas características muy interesantes, como su estabilidad, bajo coste de producción, alta bioseguridad y su reproducibilidad<sup>12-14</sup>. Además, los polímeros presentan una gran versatilidad, ya que el gran número de posibles estructuras monoméricas polimerizables (comerciales o de síntesis) y la química de polímeros permite preparar sistemas transportadores prácticamente a medida. Muchos de los vectores poliméricos desarrollados hasta el momento son derivados cationizables portadores de aminas alifáticas primarias, secundarias o terciarias. A una proporción determinada polímero/ADN, también denominada relación N/P, refiriéndose N al grupo amino del polímero catiónico y P al grupo fosfato de las bases nitrogenadas del DNA, el polímero puede condensar el ADN dando lugar a complejos con tamaños compatibles con la internalización celular, proporcionando, además, una protección estérica frente a la degradación por nucleasas.



El camino que deben recorrer los complejos polímero/ADN hasta llegar al interior de las células del tejido diana está lleno de obstáculos, ya que los *polyplexes*, complejos polielectrolíticos polímero/ADN, pueden interactuar con componentes sanguíneos, y ser eliminados prematuramente, antes de poder atravesar la barrera endotelial para llegar al tejido donde se localiza la célula diana. Además, muchos de estos obstáculos que encuentra el complejo polímero/ADN en su camino hacia la liberación del ADN en el núcleo, están relacionados con su tamaño, como por ejemplo la extravasación o la internalización celular. El endotelio de la mayoría de los tejidos es bastante impermeable, con fenestraciones de pequeño diámetro (30 nm). Solamente ciertas zonas tumorales y órganos con fenestraciones irregulares, como el hígado, bazo o la médula ósea, que poseen un endotelio con mayores fenestras (100 nm), que permiten la extravasación de los complejos. En el caso de tumores, su rápida y descontrolada formación y vascularización hace que el endotelio se encuentre desorganizado, facilitando la extravasación y acumulación de los complejos en el interior de éstos, siendo este un mecanismo conocido como *enhanced permeability and retention (EPR)*. El tamaño puede ser también muy importante en la internalización celular mediante endocitosis, ya que se ha visto que algunos tipos celulares sólo son capaces de endocitar micropartículas con un tamaño comprendido entre 50 y 200 nm<sup>15-20</sup>. Debido a todas estas razones, en este trabajo se ha hecho especial énfasis en la caracterización del tamaño de los *polyplexes*

Además, si tras este largo viaje los *polyplexes* han logrado llegar con éxito hasta la célula diana, a continuación deben internalizarse en ella, normalmente mediante endocitosis, y liberar el ADN para que llegue al núcleo y éste sea expresado. Todo este proceso, representado en la **figura 1.1**, debe ser llevado a cabo, además, sin matar a la célula. Debido a esto, el diseño del polímero, así como las características del complejo son vitales para el éxito el proceso de transfección, y además, es necesario tener en cuenta que para la mayoría de los vectores poliméricos usados hoy día se acepta generalmente que sólo una pequeña fracción de la dosis aplicada llega a expresarse satisfactoriamente<sup>15, 21-22</sup>, por lo que sigue existiendo un enorme esfuerzo investigador para conseguir sistemas de esta naturaleza más eficientes y con niveles de transfección cercanos a los mostrados por los vectores de origen viral.

## 1. Introducción general

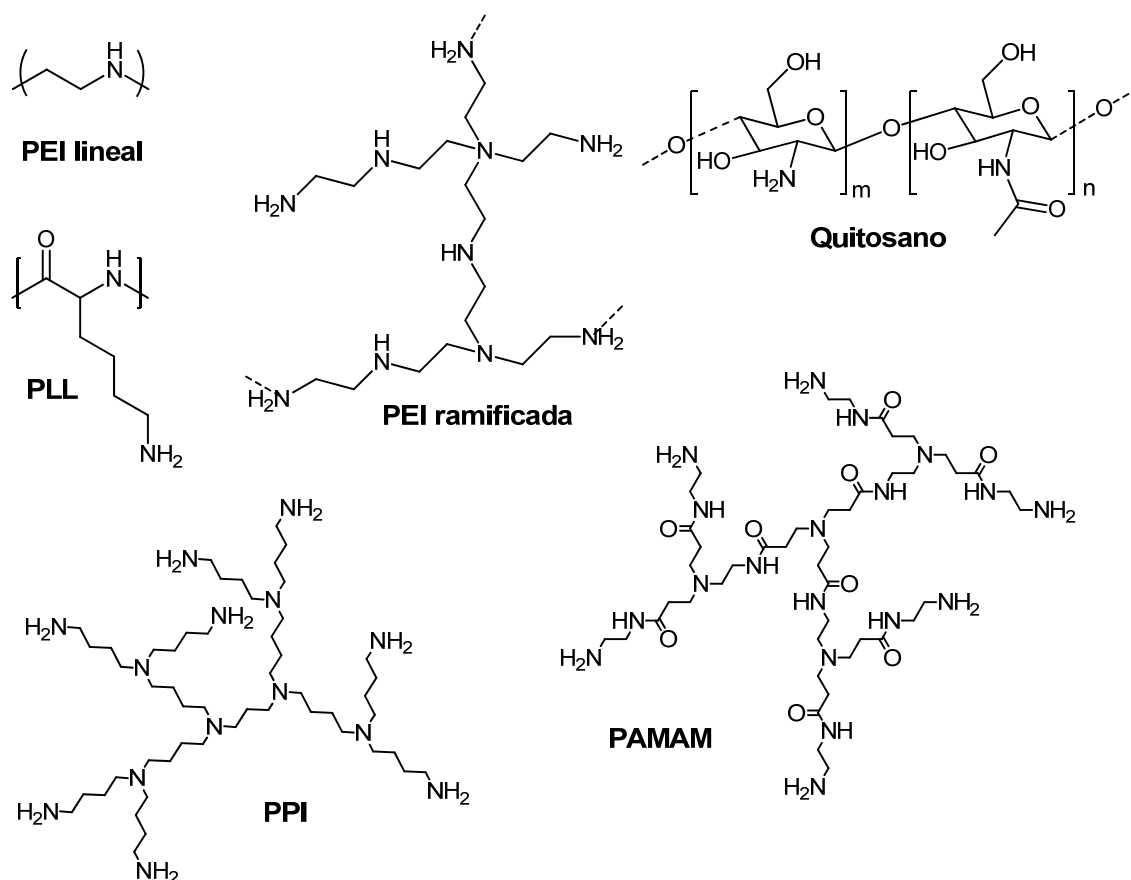


**Figura 1.1.** Representación esquemática del recorrido y las barreras con las que se encuentran los *polyplexes* utilizados en terapia génica, desde su inyección en el torrente sanguíneo hasta su llegada a la célula. El proceso intracelular aparece representado en una escala mayor en la **figura 3.1** del **Capítulo 3** de la presente tesis doctoral.

En la **figura 1.2** se muestran las estructuras de los polímeros aminados más representativos en este campo. El orden de pK de las aminas alifáticas es el siguiente: primaria>secundaria>terciaria, siendo el pK de las aminas primarias cercano a 9-10 mientras que las de las aminas terciarias pueden estar cercano a 7 e incluso por debajo. Por ello, las aminas primarias están mucho más protonadas a pH 7 que las secundarias y terciarias. Estas diferencias tienen diferentes implicaciones en la complejación con el ADN y en su aplicación. Las aminas primarias ofrecen mayor densidad de carga y por tanto una complejación con DNA más eficiente. Sin embargo, esta mayor densidad de carga también se relaciona con una mayor citotoxicidad. A pesar de que todavía no son totalmente conocidos los mecanismos responsables de la citotoxicidad, la hipótesis más aceptada postula que es debida a interacciones electrostáticas entre los dominios aniónicos de la superficie celular y los dominios catiónicos presentes en el transportador. El resultado de esta interacción sería la formación de agregados que se acumularían en la superficie celular impidiendo el correcto funcionamiento de la membrana citoplasmática, produciendo la muerte de la célula. Además, una fuerte carga electrostática podría crear dificultades para la liberación del ADN transportado, debido a la fuerte interacción de cargas, una vez que éste llega a su lugar de acción.

Por otra parte, las aminas secundarias y sobre todo las terciarias pueden participar en el mecanismo denominado '*esponja de protones*' (*proton sponge effect*) (**figura 1.1**). Una vez que los *polyplexes* son internalizados mediante endocitosis, quedan englobados en una vesícula endosomal o endosoma, que va madurando y acidificándose, dando lugar a un lisosoma, mediante la acción de una ATPasa que transporta activamente protones desde el citosol hacia el interior de la vesícula. Los polímeros que contienen un gran número de aminas

secundarias y terciarias en su estructura, con un valor de  $pK_a$  cercano o inferior a 7, tienen un efecto tamponador del pH en dicha vesícula, ya que son capaces de aceptar estos protones, forzando a la ATPasa a transportar más protones desde el citosol. Este flujo de protones debe ser compensado por un flujo de contraiones, en este caso, iones  $Cl^-$ . La alta concentración de iones en el endosoma causa un hinchamiento osmótico que acaba rompiendo la membrana, liberando su contenido al citoplasma<sup>15-16, 22-26</sup>. Se ha observado que los polímeros que poseen estos grupos amino, o a los que se les han conjugado estos grupos mediante modificación química, y por tanto participan en la 'esponja de protones', presentan unos niveles de transfección significativamente superiores a los mostrados por polímeros que no participan en este fenómeno.



**Figura 1.2.** Estructura química de las formas lineal y ramificada de la polietilenimina (PEI) y la forma lineal de la poli(L-lisina) (PLL). Estos dos polímeros catiónicos son utilizados habitualmente en estudios de transfección, tanto como control positivo, como para estudiar el efecto de su modificación o derivatización en este proceso. En esta figura también se representa la estructura química de las dos familias más importantes de dendrímeros, los derivados de polipropilenimina (PPI) y de poliamidoamina (PAMAM). Finalmente, también se representa la estructura química del quitosano.

Los primeros trabajos con polímeros como vectores no virales en terapia génica se llevaron a cabo utilizando polietilenimina (PEI), cuyas posibles estructuras se representan en la **figura 1.2**. Este polímero es la macromolécula orgánica con mayor densidad potencial de carga, ya que cada tercer átomo es un grupo amino que puede ser protonado<sup>24</sup>. Los polímeros

## 1. Introducción general

de PEI en un principio brindaron resultados muy prometedores en terapia génica. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas que presentan niveles de transfección significativamente superiores a los obtenidos con PEI, por lo que ésta ha sido relegada a una función como control positivo en los ensayos con vectores no virales en terapia génica, siendo el polímero de referencia con el que se comparan los resultados obtenidos por los nuevos sistemas en estudio<sup>25</sup>. Se han sintetizado polímeros tipo PEI con muy diferentes pesos moleculares y grados de ramificación para su evaluación *in vitro* e *in vivo*, aunque los más utilizados son el hiperramificado de 25 kDa, algunos de bajo grado de ramificación y polímeros lineales de diferentes pesos moleculares. Entre los tres tipos de grupos amino presentes en la PEI, las aminas primarias son las más implicadas en el proceso de complejación, mientras que las aminas secundarias y terciarias participan en el fenómeno conocido como la ‘esponja de protones’ tal y como se ha mencionado anteriormente.

Los polímeros de PEI son capaces de complejar de forma efectiva moléculas de ADN de gran longitud, formando partículas esféricas con un diámetro cercano a los 100 nm, que son capaces de transfectar células *in vivo* e *in vitro*, ofreciendo además una alta protección frente al ataque de nucleasas. Esta protección es mayor en el caso de la PEI ramificada, al formar una capa protectora más gruesa sobre el plásmido. Sin embargo, su gran densidad de cargas positivas también le proporciona una alta toxicidad, la cual es uno de los principales factores limitantes para su aplicación *in vivo*. Se ha demostrado que la PEI no complejada induce muerte celular mediante un proceso de apoptosis. Tras dos horas de exposición de las células a la PEI libre, la mayoría de éstas mueren por desestabilización de la membrana celular, mediado por la activación de la ruta de las caspasas. Sin embargo, esta toxicidad se ve significativamente reducida mediante la complejación de la PEI con ADN. Las mayores eficiencias de transfección se obtienen con los polímeros con un peso molecular superior a 25 kDa, ramificados o lineales, aunque la toxicidad mostrada por estos sistemas también es alta. Los sistemas con un peso molecular inferior a 25 kDa presentan menores niveles de transfección, aunque en este caso su toxicidad es menor que la mostrada por sistemas de mayor peso molecular. Las PEI de bajo peso molecular forman *polyplexes* de gran tamaño, cercano a 500 nm de diámetro, en los que el polímero interacciona de forma débil con el ADN, sin llegar a protegerlo de las enzimas del medio, tanto extracelular, como citoplásmico. Además del peso molecular, el grado de ramificación de las PEI también influye en sus propiedades en el proceso de transfección, ya que dada su gran densidad de ramificación, tiene una mayor densidad de carga que un polímero lineal de igual peso molecular<sup>16, 26-35</sup>.

Otro de los polímeros más ampliamente estudiados en terapia génica, y utilizado también como control positivo en estos estudios es la poli(L-lisina) (PLL), cuya estructura se muestra en la **figura 1.2**. Debido a su estructura peptídica, la PLL es biodegradable, una propiedad que la hace especialmente adecuada para utilización *in vivo*, aunque la naturaleza primaria de las aminas le confiere una alta densidad de carga y presenta ciertos niveles de

toxicidad, principalmente induciendo apoptosis<sup>29</sup>. Si se preparan complejos polielectrolíticos con ADN utilizando PLL, éstos serán internalizados por las células con una eficiencia similar a los formados con PEI, aunque los niveles de transfección suelen ser varios órdenes de magnitud inferiores, debido a que la PLL carece de grupos amino capaces de actuar en la 'esponja de protones'. Para solventar este inconveniente se ha propuesto la inclusión del grupo heterocíclico imidazol en la cadena polimérica, lo cual ha aumentado la eficiencia. Esta alta eficiencia de transfección ha sido atribuida al valor de  $pK_a$  del heterociclo, cercano a 6, lo que permite que una gran proporción de grupos amino estén desprotonados, participando en la 'esponja de protones', ayudando al complejo polímero/ADN en el escape del lisosoma. La modificación de los grupos amino de polímeros derivados de la PLL usando histidina u otras estructuras portadoras del anillo de imidazol, han mostrado un incremento significativo en la expresión del gen marcador en el proceso de transfección<sup>16, 25-26, 36-37</sup>.

Otra familia de polímeros estudiados en terapia génica son los dendrímeros, macromoléculas ramificadas con un alto grado de uniformidad, una distribución muy estrecha de pesos moleculares y una superficie con una alta densidad de grupos funcionales (**figura 1.2**). Los primeros trabajos utilizando dendrímeros como vectores no virales en terapia génica se remontan a 1993, utilizando dendrímeros derivados de poliamidoamina (PAMAM). En años posteriores se llevaron a cabo trabajos con otras familias de dendrímeros catiónicos, utilizando diferentes líneas celulares, obteniendo *polyplexes* estables en el medio fisiológico y buenos resultados de transfección, incluso en experimentos *ex vivo*. Desde entonces se han llevado a cabo numerosos ensayos con diferentes tipos de dendrímeros, observándose cómo el grado de compactación de los grupos funcionales en superficie, la estructura del núcleo, la generación del dendrímero, así como la naturaleza de los grupos funcionales en superficie, son determinantes para su eficiencia de transfección. Respecto a su biocompatibilidad, se ha observado que los dendrímeros PAMAM muestran mejores resultados de biocompatibilidad que los dendrímeros derivados de la polipropilenimina (PPI)<sup>38-41</sup>.

Finalmente, otro de los polímeros catiónicos estudiados en terapia génica, y cuya aplicación sería muy interesante debido a su origen natural, es el quitosano (**figura 1.2**). El quitosano es una familia de aminopolisacáridos lineales formados por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina en proporción variable, unidas por enlaces  $\beta$ 1-4, obtenida mediante desacetilación alcalina de la quitina, el segundo polisacárido natural más abundante. El quitosano es un compuesto no tóxico por vía oral, por lo que ha sido utilizado como aditivo en la industria alimentaria durante años. Dependiendo de su peso molecular y grado de desacetilación puede formar complejos estables con ADN con un tamaño de partícula cercano a 100 nm. Utilizando quitosano de peso molecular en el rango entre 30 y 170 kDa, y un alto grado de protonación se puede obtener una eficiencia de transfección similar a la obtenida con PEI. Sin embargo, el quitosano es incapaz de intervenir en la 'esponja de protones' ya que presenta aminas alifáticas primarias. Se cree que su liberación del endosoma es debida a su

## 1. Introducción general

degradación en unidades más pequeñas mediante enzimas lisosomales, incrementando la presión osmótica en el interior del lisosoma, provocando la rotura de éste y la consiguiente liberación del ADN en el citoplasma, haciendo este proceso de liberación de material genético con estos sistemas más lento que con otros polímeros<sup>16</sup>.

Todos estos polímeros aminados cationizables presentan una alta densidad de carga y una citotoxicidad inherente asociada a la misma, la cual limita también su eficiencia en transfección. Una de las principales estrategias llevadas a cabo para reducir la citotoxicidad y aumentar la eficiencia de transfección ha sido la conjugación de estos polímeros aminados, con polímeros neutros, biocompatibles e hidrosolubles como el polietilenglicol (PEG). Mediante la conjugación del PEG sobre polímeros preformados, o anclaje sobre las aminas libres de *polyplexes* previamente formados se han logrado partículas con un diámetro aproximado de 100 nm, una carga superficial cercana a la neutralidad, y una mayor vida media en el torrente sanguíneo. Sin embargo, se ha observado que la presencia del PEG a veces dificulta la internalización celular y el escape del lisosoma<sup>16, 42</sup>.

Otros diseños que incorporan polímeros o entidades neutras anfífilas a las poliaminas son aquellos que incorporan bloques o injertos de polimetacrilamida de hidroxipropilo (poli-HPMA) o unidades de ciclodextrina (CD), cuyas unidades precursoras polimerizables han sido usadas en este trabajo.

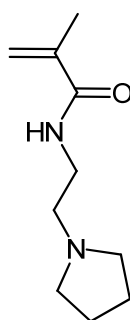
### 1.1. Diseño propuesto en este trabajo

Todos los ejemplos mencionados antes son poliaminas o derivados de poliaminas preformadas con otros polímeros neutros biocompatibles o con unidades de CD. Existe, sin embargo, otra estrategia que está siendo explorada por nuestro grupo de trabajo, se trata de una estrategia '*bottom-up*' basada en la elección adecuada de monómeros precursores portadores de diferente funcionalidad seguida de su copolimerización. Esta estrategia permite incorporar en una sola cadena unidades complementarias optimizando la interacción entre ambas estructuras, y además permite modular de forma muy simple la carga de cada componente mediante simple ajuste composicional.

En concreto en este trabajo se han preparado diferentes sistemas de dos componentes que combinan unidades portadoras de aminas terciarias (capaces de participar en la '*esponja de protones*') con unidades complementarias como la metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo) (HPMA) o diferentes unidades glucosídicas que incluyen derivados de CD. Una vez elegidos los monómeros, los vectores poliméricos se han obtenido mediante simple polimerización radical convencional. Como monómeros portadores de grupos catiónicos (o cationizables) responsables de la complejación con ADN y por tanto imprescindibles en el diseño, se han

usado los derivados representados en las **figuras 1.3 y 1.4**, portadores de dos tipos de aminas terciarias.

Uno de ellos es la metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina (EPA), un monómero derivado de pirrolidina, cuyo grupo amino terciario (ver **figura 1.3**) se encuentra mayoritariamente protonado en condiciones fisiológicas. Este monómero fue sintetizado por primera vez por nuestro grupo de trabajo<sup>43</sup>. El homopolímero poli-EPA fue evaluado en cuanto a su capacidad de complejar ADN, mostrando su capacidad de formar complejos de un tamaño apropiado para la internalización celular, y estables en disolución, siendo capaz de transfectar cultivos celulares, mostrando cierto grado de citotoxicidad. En trabajos posteriores de nuestro grupo de investigación<sup>44</sup>, se sintetizaron telómeros de EPA, oligómeros obtenidos mediante la utilización de cisteamina como agente de transferencia durante el proceso de polimerización. Estos telómeros mostraron niveles de transfección significativamente superiores a los obtenidos con poli-EPA de alto peso molecular, probablemente debido tanto a su menor peso molecular, como a la presencia del grupo amino primario terminal formado como consecuencia de la utilización de la cisteamina. En este estudio de evaluación de derivados de EPA, además, se exploraron como vectores copolímeros estadísticos de EPA con el monómero neutro e hidrosoluble dimetilacrilamida (DMA), dando lugar a sistemas con mayores niveles de transfección que el homopolímero poli-EPA, aunque incapaces de superar los niveles de transfección del control positivo PLL y de los telómeros de EPA. Este estudio preliminar de copolímeros estadísticos de EPA y DMA debe de considerarse como un antecedente del estudio planteado en esta tesis doctoral, que analiza con mayor profundidad y variabilidad estructural la relevancia en terapia génica de la combinación estadística en copolímeros de estos dos tipos unidades complementarias (la cationizable, incluido el EPA de la **figura 1.3**, y la neutra). En las siguientes párrafos y figuras se detallan las estructuras monoméricas precursoras elegidas para este estudio, comenzando con las cationizables.

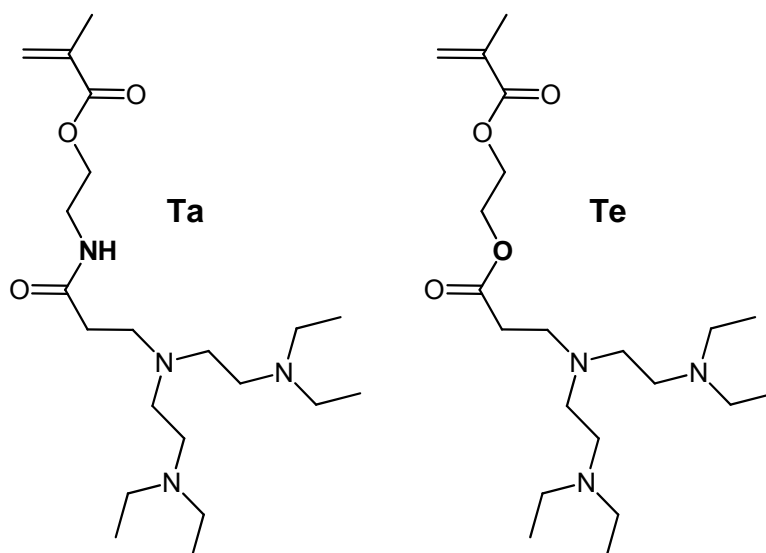


**Figura 1.3.** Estructura química de la metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina (EPA).

Además del EPA, en este trabajo se han sintetizado y caracterizado otros dos monómeros cationizables, derivados de la triamina dentrítica *N,N,N',N'*-tetraetildietilentriamina (TEDETA), que han sido sintetizados por primera vez en esta tesis (**figura 1.4**), mediante una reacción selectiva de adición de Michael sobre entrecruzantes diacrílicos asimétricos metacrilato-R-acrilato o metacrilato-R'-acrilamida. Esta adición selectiva se debe a que los

## 1. Introducción general

grupos acrilato y acrilamida son mejores aceptores de Michael que los metacrilatos, aceptando nucleófilos débiles como los grupos amino o tiol<sup>45-48</sup>. Cuando se utilizan aminas como nucleófilos, hay un aspecto a tener en cuenta en esta reacción, ya que su adición sobre grupos acrilato da lugar a un  $\beta$ -amino éster sensible a la hidrólisis en medio acuoso<sup>49-51</sup>. Sin embargo, su adición sobre grupos acrilamida da lugar a un grupo amida estable. De este modo la estabilidad o degradabilidad de la molécula, puede ser definida mediante la utilización de un grupo acrilato o acrilamida como aceptor de Michael.



**Figura 1.4.** Representación esquemática de los monómeros acrílicos derivados de la amina dendrónica TEDETA sintetizados y estudiados en la presente tesis doctoral.

La polimerización radical de estos nuevos metacrilatos derivados de TEDETA dará lugar a un producto muy atractivo en campos como la polimerización controlada mediante *Atom Transfer Radical Polymerization* (ATRP), ya que TEDETA es un conocido ligando en ATRP y que puede ser utilizado para eliminar catalizadores metálicos, como el cobre, del medio de reacción<sup>52</sup>. En el presente trabajo, se han sintetizado en primer lugar los monómeros, y después se han polimerizado, mediante una aproximación '*bottom-up*' que proporciona una gran flexibilidad para el diseño de macromoléculas, ya que las propiedades de las cadenas poliméricas pueden ser moduladas mediante la proporción de los monómeros utilizados. Además, estos sistemas han mostrado poseer una doble sensibilidad: además de la dependencia con el pH asociada a la (des)protonación de la amina, estos sistemas han mostrado termosensibilidad negativa en agua, disminuyendo su solubilidad en medio acuoso al aumentar la temperatura y precipitando cuando alcanzan una temperatura crítica, denominada *lower critical solution temperature* (LCST)<sup>53</sup>.

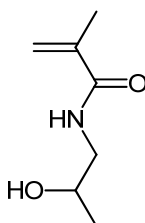
Como se ha mencionado, aminas terciarias como las propuestas en las **figuras 1.3 y 1.4**, además de proporcionar la carga positiva necesaria para la interacción electrostática con el ADN y de exhibir una toxicidad reducida si se compara con aminas primarias y secundarias,



pueden tener un papel clave tras la internalización celular de los *polyplexes*, mediante su participación en la ‘*esponja de protones*’.

Siguiendo con el diseño ‘*bottom-up*’ propuesto para este trabajo, se han elegido además de las unidades cationizables, diferentes unidades neutras. En concreto se han seleccionado el HPMA, y derivados estirénicos portadores de  $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -CD, en sus formas hidroxilada y permetilada.

El HPMA, cuya estructura se muestra en la **figura 1.5**, es un monómero ampliamente estudiado en aplicaciones biomédicas desde que fuera aplicado por primera vez en los años 70 en forma de homopolímero con el objetivo de desarrollar un expansor de plasma, denominado *Duxon*. Los primeros copolímeros de HPMA fueron desarrollados por Kopecek *et al.* y han sido ampliamente investigados, debido a su solubilidad en agua y a su carácter no tóxico, en liberación controlada de fármacos. En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de cómo los sistemas de liberación de fármacos basados en este monómero presentan una alta vida media en el torrente sanguíneo. La gran versatilidad de estos copolímeros permiten la creación de conjugados con una amplia variedad de fármacos, tales como los taxanos, campotecinas, dexametasona, así como con anticancerígenos como doxorubicina. Algunos de estos tratamientos se encuentran actualmente en fases avanzadas de estudios clínicos. Estos estudios han demostrado que los conjugados polímero-fármaco pueden ser administrados por vía parenteral de forma segura, demostrando actividad anticancerígena. En los últimos años, y debido a estos buenos resultados, se ha comenzado a estudiar este polímero también para su posible aplicación en vectores no virales en terapia génica, principalmente mediante su conjugación con poliaminas como PLL. En la literatura se pueden encontrar varios ejemplos de cómo copolímeros de bloque con péptidos de lisina e histidina han permitido obtener sistemas con una biocompatibilidad significativamente incrementada, manteniendo, e incluso mejorando, su eficiencia de transfección<sup>54-64</sup>.



**Figura 1.5.** Estructura química de metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo) (HPMA).

Por otra parte, en este trabajo se ha combinado también la unidad EPA portadora de amina con diferentes derivados estirénicos portadores de  $\alpha$ -glucosa y  $\beta$ -CD en sus formas hidroxilada y permetilada, monómeros que han sido sintetizados para este trabajo por el Grupo de Química Orgánica Biológica del IQOG-CSIC. Las CD son una familia de oligosacáridos

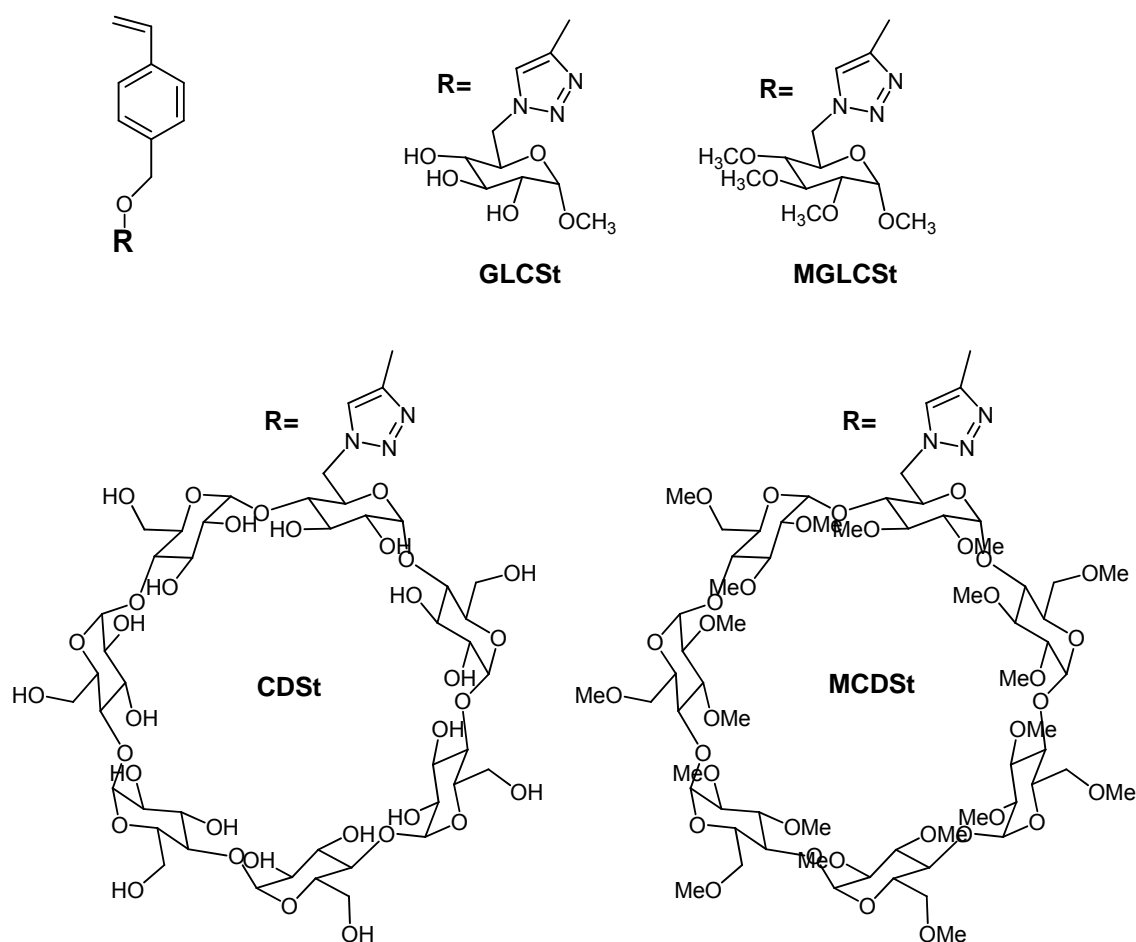
## 1. Introducción general

cíclicos obtenidos a partir del almidón, aprobados por la FDA, y ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria. La estructura de todos los derivados glicosídicos derivados de glucosa y CD ha sido representada en la **figura 1.6**. La incorporación de estos restos laterales glicosídicos en la cadena polimérica puede tener un papel relevante en la internalización ya éstos pueden interaccionar con la membrana, como por ejemplo la glucosa que puede reconocer específicamente con lectinas de membrana. En cuanto a la permetilación, el uso de glucosa permetilada y otros sacáridos apolares es un campo muy novedoso que se está empezando a explorar. Se ha descrito muy recientemente su uso en la transfección de ARN interferente (siRNA)<sup>78</sup>. Por otra parte, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos utilizando polímeros catiónicos conjugados con CD como vectores no virales en terapia génica<sup>65</sup>. Estos trabajos se han llevado a cabo mediante diversas aproximaciones, que incluyen tanto su anclaje a polímeros catiónicos preformados, como PEI o dendrímeros PAMAM<sup>69, 79-81</sup>, así como su derivatización para obtener monómeros difuncionales a partir de ellas, que son copolimerizados con otros monómeros difuncionales, como las poliamidas, obteniendo polímeros lineales que incluyen las unidades de CD en la cadena principal<sup>82-83</sup>. Por último, otra estrategia ampliamente estudiada consiste en utilizar el anillo oligosacárido como núcleo de polimerización para obtener polímeros ramificados mediante una síntesis divergente<sup>84-87</sup>. Esta inclusión de CDs ha permitido obtener copolímeros que presentan menor toxicidad que el polímero de origen. A diferencia de estos ejemplos de uso de las CDs, en la presente tesis doctoral, tanto el anillo oligosacárido de  $\beta$ -CD como las unidades de  $\alpha$ -glucosa han sido derivatizados con un grupo estirénico polimerizable, lo que permite su fácil copolimerización con los monómeros metacrílicos cationizables mencionados anteriormente, obteniendo copolímeros que contienen los dos tipos de estructuras distribuidas estadísticamente a lo largo de las cadenas. Esta aproximación *bottom up* usada en esta tesis, basada en la copolimerización de monómeros complementarios y que ha sido poco descrita en la bibliografía para la combinación estructural mencionada en esta aplicación, proporciona estructuras en las que la distribución de secuencias es muy diferente de las estructuras de injerto o bloque más reportadas en la literatura.

Otra particularidad del anillo oligosacárido de las CD es que puede formar complejos de inclusión con pequeños compuestos hidrofóbicos, como el adamantano que quedan incluidos dentro de la cavidad de la CD. Esta capacidad puede permitir modificar la superficie de los complejos polielectrolíticos sin interferir en las interacciones polímero/ADN ni modificar la morfología de éstos<sup>65-71</sup>. En relación con las propiedades de esta cavidad, las CD no permetiladas son capaces de extraer fosfolípidos y colesterol de membrana, pudiendo llegar a causar la desestabilización de la membrana celular, y por tanto la muerte de las células expuestas a ellas durante períodos de tiempo prolongados. En ensayos realizados con hematíes, se ha observado que una exposición prolongada de éstos a  $\beta$ -CD provoca su lisis, y la consecuente liberación de hemoglobina al medio de cultivo. En este contexto, se ha descrito que la forma permetilada de  $\beta$ -CD es más eficiente que la no permetilada extrayendo

colesterol. Todas estas interacciones están relacionadas con la cavidad del anillo oligosacárido, siendo además interacciones no específicas con los componentes de membrana, aunque este proceso parece depender de la naturaleza de la membrana<sup>72-76</sup>. En cualquier caso, están aprobadas por la FDA y debido a su posible interacción con la membrana será interesante estudiar cómo afectan unidas lateralmente a una cadena polimérica en la funcionalidad de complejos en terapia génica. También ha sido demostrado que este derivado permetilado de  $\beta$ -CD permite la estabilización de nanoobjetos<sup>77</sup>, lo cual puede ser de interés para la estabilización de los complejos con ADN.

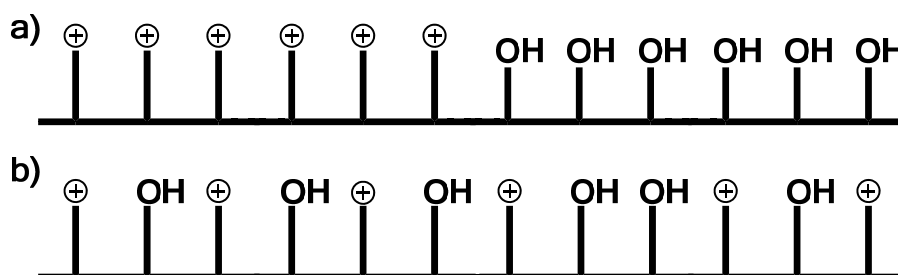
Por tanto, se han preparado las estructuras de la **figura 1.6**, con el fin de estudiar comparativamente la influencia en transfección y citotoxicidad de la incorporación a los vectores de ciclos glicosídicos en forma de monosacáridos o en forma de estructuras complejas tipo  $\beta$ -CD, así como evaluar la importancia de la permetilación en ambas estructuras.



**Figura 1.6.** Estructura química de los diferentes monómeros estirénicos derivados de las formas hidroxilada y permetilada de la  $\beta$ -CD y la  $\alpha$ -glucosa.

## 1. Introducción general

Se ha mencionado a lo largo de esta Introducción que en este trabajo se han preparado y estudiado copolímeros estadísticos de dos componentes, uno portador de amina cationizable y otro neutro portador de funcionalidades complementarias. En la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos que combinan estos dos tipos de estructuras pero en la mayoría de ellos, estas se combinan en estructuras de injerto o bloque a partir de polímeros preformados de al menos alguno de los dos componentes. Para ilustrar las diferencias entre los dos tipos de combinaciones, en la **figura 1.7** se muestran esquemáticamente dos secuencias correspondientes a dos copolímeros de bloque y estadístico con la misma cantidad relativa de unidad cationizable y HPMA (tomado como ejemplo), que corresponderían respectivamente a uno de los ejemplos de la literatura y a uno de los vectores estudiados en este trabajo. La distribución de unidades de ambos ejemplos, que es completamente diferente, influenciará la interacción entre ambos componentes así como en la interacción del conjunto con el medio, en aspectos como la citotoxicidad intrínseca de los policationes debida a su interacción con la membrana celular, o la estabilización de los complejos con ADN. Este último punto influye en interacciones electrostáticas con componentes sanguíneos y en el tiempo de residencia en plasma, además de en la liberación intracelular<sup>15-16, 30, 43, 88-89</sup>.



**Figura 1.7.** Representación esquemática de la distribución en la cadena polimérica de unidades monoméricas con carga positiva y unidades neutras en copolímeros de bloque (a) y copolímeros estadísticos como los preparados y evaluados en esta tesis (b).

Finalmente, la aproximación '*bottom-up*' no solo ofrece una distribución estadística diferente de la de bloque o injerto, sino que proporciona una enorme versatilidad y flexibilidad en la síntesis de nuevos sistemas poliméricos ya que se pueden preparar sistemas polifuncionales casi a medida mediante la apropiada elección de monómeros precursores y su relación molar en la copolimerización.

### 1.2. Hipótesis y objetivos de esta tesis

Este trabajo parte de la hipótesis de que la distribución estadística de unidades que se obtiene mediante la copolimerización de especies neutras, biocompatibles e hidrosolubles, con monómeros catiónicos ó cationizables portadores de aminas terciarias, y por tanto capaces de formar complejos polielectrolíticos con ácidos nucleicos e introducir este material genético en las células vivas, puede tener una influencia en el balance transfección-citotoxicidad de los *polyplexes* derivados de dichos copolímeros.

Los objetivos concretos de este trabajo son:

1. Diseñar, sintetizar y caracterizar monómeros catiónicos portadores de aminas terciarias, así como monómeros neutros e hidrosolubles.
2. Obtener y caracterizar sistemas copoliméricos estadísticos de dos componentes utilizando diferentes proporciones molares de monómeros elegidos de las dos familias mencionadas (sistemas cationizables y neutros), mediante copolimerización radical convencional.
3. Evaluar su posible aplicación como vectores no virales en terapia génica, determinando su capacidad de complejar ADN, así como su citotoxicidad y eficiencia de transfección *in vitro*, y relacionar sus resultados en este tipo de aplicaciones con su estructura y propiedades.

## 1. Introducción general

### 1.3. Bibliografía

1. P. D. Robbins, S. C. Ghivizzani. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* **1998**, 80, 1, 35-47
2. H. G. Abdelhady, S. Allen, M. C. Davies, C. J. Roberts, S. J. Tendler, P. M. Williams. Direct real-time molecular scale visualisation of the degradation of condensed DNA complexes exposed to DNase I. *Nucleic Acids Res* **2003**, 31, 14, 4001-5
3. D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, *et al.* Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* **1999**, 6, 4, 482-97.
4. D. V. Schaffer, D. A. Lauffenburger, Optimization of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J Biol Chem* **1998** 273, 43, 28004-9
5. M. A. Hickman, R. W. Malone, K. Lehmann-Bruinsma, T. R. Sih, D. Knoell, F. C. Szoka, R. Walzem, D.M. Carlson, J.S. Powell. Gene expression following direct injection of DNA into liver. *Hum. Gene Ther.* **1994**, 5, 1477-1483
6. J. M. Wells, L. H. Li, A. Sen, G. P. Jahreis, S. W. Hui. Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors. *Gene Ther*, **2000**, 7, 541-547
7. A. L. Rakchmilevich, J. G. Timmins, K. Janssen, E. L. Pohlmann, M. J. Sheehy, N. S. Yang. Gene gun-mediated IL-12 gene therapy induces antitumor effects in the absence of toxicity: a direct comparison with systemic IL-12 protein therapy. *J. Immunother.* **1999**, 22, 135-144
8. M. A. Stackhouse, J. J. Buchsbaum. Radiation to control gene expression. *Gene Ther.* **2000**, 7, 1085-1086
9. S. Gottschalk, R. J. Cristiano, L. C. Smith, S. L. Woo. Folate receptor mediated DNA delivery into tumor cells: lysosomal disruption results in enhanced gene expression. *Gene Ther.* **1994**, 1, 185-191
10. R. Amini, H. Hosseinkhani, A. S. Abdulmir, R. Rosli, F. A. Jalilian. Engineered Smart Biomaterials for Gene Delivery. *Gene Therapy and Molecular Biology.* **2012**, 14, 72
11. L. Vannucci, M. Lai, F. Chiuppesi, L. Ceccherini-Nelli, M. Pistello. Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*, **2013**, 36, 1-22
12. G. J. Nabel, E. G. Nabel, Z. Y. Yang, B. A. Fox, G. E. Plautz, X. Gao, L. Huang, S. Shu, D. Gordon, A. E. Chang. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90, 11307-11311
13. H. Eliahu, J. Barenholz, A. J. Domb. Polymers for DNA delivery. *Molecules*, **2005**, 10, 34-64
14. M. D. Brown, A. G. Schaltzein, I. J. Uchegbu. Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *Int. J. Pharm.* **2001**, 229, 1-21
15. S. Y. Wong, J. M. Pelet, D. Putnam. Polymers for gene delivery: past, present and future. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 799-837
16. T. Merdan, J. Kopecek, T. Kissel. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 715-758
17. C. A. Fernández, K. G. Rice. Engineered Nanoscaled Polyplex Gene Delivery Systems. *Mol. Pharmaceutics*, **2009**, 6, 5, 1277-1289
18. N. Wiradharma, Y. Zhang, S. Ventakaraman, J. L. Hedrick, Y. Y. Yang. Self-assembled polymer nanostructures for delivery of anticancer therapeutics. *Nano Today* **2009**, 4, 302-317
19. M. S. Shim, Y. J. Kwon. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 1046-1059

20. J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z. R. Lu. HPMa copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, 61-81
21. D. Oupicky, M. Ogris, K. A. Howard, P. R. Dash, K. Ulbrich, L. W. Seymour. Importance of Lateral and Steric Stabilization of Polyelectrolyte Gene Delivery Vectors for Extended Systemic Circulation. *Mol. Ther.* **2002**, 5, 4, 463-472
22. J. K. Medina-Kauwe, J. Xie, S. Hamm-Álvarez. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Therapy* **2005**, 12, 1734–1751
23. B. I. Florea, C. Meaney, H. E. Junginger, G. Borchard. Transfection Efficiency and Toxicity of Polyethylenimine in Differentiated Calu-3 and Nondifferentiated COS-1 Cell Cultures. *AAPS PharmSci* **2002**, 4, 3, article 12
24. D. Schmaljohann. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1655–1670
25. D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov.* **2005**, 4, 7, 581-93.
26. C. H. Xu, M.H. Sui, J. B. Tang, Y. Q. Shen. What can we learn from virus in designing nonviral gene vectors. *Chinese Journal of Polymer Science* **2011**, 29, 3, 274-287
27. W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* **2001**, 22, 471-480
28. A. C. Hunter. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1523–1531
29. H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **2006**, 114, 100–109
30. D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Kriegelstein, T. Kissel. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, 24, 1121–1131
31. W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos. Size matters: Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle. *J Biomed Mater Res* **1999**, 45, 268-75
32. H. Petersen, K. Kunath, A. L. Martin, S. Stolnik, C. J. Roberts, M. C. Davies, T. Kissel. Star-Shaped Poly(ethylene glycol)-block-polyethylenimine Copolymers Enhance DNA Condensation of Low Molecular Weight Polyethylenimines. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 926-936
33. O. Boussif, F. Lezoualch, M. A. Zanta, M. D. Merny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, 92, 7297-7301
34. B. Yang, Y. Sun, W. Yi, J. Yang, C. Liu, H. Cheng, J. Feng, X. Zhang, R. Zhuo. A linear-dendritic cationic vector for efficient DNA grasp and delivery. *Acta Biomaterialia* **2012**, 8, 2121–2132
35. W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos. Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **1999**, 60, 149–160
36. J. M. Bennis, J. S. Choi, R. I. Mahato, J. S. Park, S. W. Kim. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) comb shaped polymer. *Bioconjugate Chem.* **2000**, 11, 637-645
37. S. Mishra, J. D. Heidel, P. Webster, M. E. Davis. Imidazole groups on a linear, cyclodextrin-containing polycation produce enhanced gene delivery via multiple processes. *Journal of Controlled Release* **2006**, 116, 179–191

## 1. Introducción general

38. N. Larson, H. Ghandehati. Polymeric conjugates for drug delivery. *Chem. Mater.* **2012**, 24, 840–853
39. D. G. Shcharbin, B. Klajnert, M. Bryszewska. Dendrimers in gene transfection. *Biochemistry (Moscow)* **2009**, 74, 10, 1070-1079
40. M. A. Mintzer, M. W. Grinstaff. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem. Soc. Rev* **2011**, 40, 173–190
41. M. Ina. Dendrimer; a novel drug delivery system. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*; **2011**, 1, 2, 70-74
42. M. S. Shim, Y. J. Kwon. Stimuli-responsive polymers and nanomaterials for gene delivery and imaging applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, 64, 1046–1059
43. D. Velasco, C. Elvira, J. San Román. New stimuli-responsive polymers derived from morpholine and pyrrolidine. *J Mater Sci: Mater Med* **2008**, 19, 1453–1458
44. D. Velasco, E. Collin, J. San Román, A. Pandit, C. Elvira. End functionalized polymeric system derived from pyrrolidine provide high transfection efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, 79, 485–494
45. E. Juaristi, V. Soloshonok, Enantioselective synthesis of beta-amino acids. Wiley-VCH **2005**.
46. M. Liu, M. P. Sibi. Recent advances in the stereoselective synthesis of  $\beta$ -amino acids. *Tetrahedron* **2002**, 58, 40, 7991-8035
47. P. Teyssie, J. Baran, P. Dubois, R. Jerome, J. S. Wang, J. Yu. Living anionic polymerization of (meth)acrylic esters. New mechanistic concepts and resulting materials. *Macromol Symp* **1998**, 132, 303–307.
48. B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, 487–531
49. D. M. Langer. Degradable Poly( $\beta$ -amino esters) Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *JACS* **2000**, 122, 10761-10768.
50. Y. B. Lim, Y. H. Choi., and J. S. Park, A Self-Destroying Polycationic Polymer Biodegradable JACS **1999**, 121, 5633-5639
51. A. Metters, J. Hubbell. Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1, 290-301
52. Y. Shen, H. Tang, S. Ding. Catalyst separation in atom transfer radical polymerization. *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 1053-1078
53. D. Schmaljohann. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1655–1670
54. L. Sprincl, J. Exner, O. Sterba, J. Kopecek. New types of synthetic infusion solutions. III. Elimination and retention of poly-[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] in a test organism. *J Biomed Mater Res* **1976**, 10, 953-956
55. J. Kopecek, H. Bazilova, Poly[N-(hydroxypropyl)methecrylamide]. I. Radical polymerization and copolymerisation, *Eur. Polym. J.* **1973**, 9, 7–14.
56. L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. J. Kerr, D. Rea, M. Whitlock, R. Poyner, C. Boivin, S. Hesslewood, C. Twelves, R. Blackie, A. Schatzlein, D. Jodrell, D. Bissett, H. Calvert, M. Lind, A. Robbins, S. Burtles, R. Duncan, J. Cassidy. Phase II studies of polymer-doxorubicin (PK1, FCE28068) in the treatment of breast, lung and colorectal cancer. *International Journal of Oncology* **2009**, 34, 1629-1636
57. R. Duncan, M. J. Vicent. Do HPMA copolymer conjugates have a future as clinically useful nanomedicines? A critical overview of current status and future opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 272–282



58. K. Ulbrich, V. Subr. Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 150–166
59. R. S. Burke, S. H. Pun. Synthesis and Characterization of Biodegradable HPMA-Oligolysine Copolymers for Improved Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 140–150
60. R. N. Johnson, R. S. Burke, A. J. Convertine, A. S. Hoffman, P. S. Stayton, S. H. Pun. Synthesis of Statistical Copolymers Containing Multiple Functional Peptides for Nucleic Acid Delivery. *Biomacromolecules* **2010**, 11, 3007–3013
61. J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z. R. Lu. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, 61-81
62. J. Kopecek, P. Kopeckova. HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 122–149
63. R. N. Johnson, D. S. H. Chu, J. Shi, J. G. Schellinger, P. M. Carlson, S. H. Pun. HPMA-oligolysine copolymers for gene delivery: Optimization of peptide length and polymer molecular weight. *Journal of Controlled Release* **2011**, 155, 303–311
64. J. G. Schellinger, J. A. Pahang, R. N. Johnson, D. S. H. Chu, D. L. Sellers, D. O. Maris, A. J. Convertine, P. S. Stayton, P. J. Horner, S. H. Pun. Melittin-grafted HPMA-oligolysine based copolymers for gene delivery. *Biomaterials* **2013**, 34, 2318-2326
65. M. E. Davis, M. E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* **2004**, 3, 12, 1023-35.
66. F. Yhaya, A. M. Gregory, M. H. Stenzel. Polymers with Sugar Buckets – The Attachment of Cyclodextrins onto Polymer Chains. *Aust. J. Chem.* **2010**, 63, 195–210
67. C. O'Driscoll, R. Darcy. Cyclodextrin Constructs for Delivery of Genotherapeutic Agents. *Bus. Brief. Pharm. Technol.* **2002**, 14, 12, 1-5.
68. H. Gonzalez, S. J. Hwang, M. E. Davis. New Class of Polymers for the Delivery of Macromolecular Therapeutics. *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1068-1074
69. M. Laird Forrest, N. Gabrielson, D. W. Pack. Cyclodextrin–Polyethylenimine Conjugates for Targeted In Vitro Gene Delivery. *Biotechnology and bioengineering*, **2005**, 89, 4, 417-423
70. S. H. Pun, N. C. Bellocq, A. Liu, G. Jensen, T. Machemer, E. Quijano, T. Schluep, S. Wen, H. Engler, J. Heidel, M. E. Davis. Cyclodextrin-Modified Polyethylenimine Polymers for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 831-840
71. M. E. Davis, N. E. Bellocq. Cyclodextrin-Containing Polymers for Gene Delivery. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2002**, 44, 17–22.
72. T. Irie, K. Uekama. Cyclodextrins in peptide and protein delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36, 101-123
73. R. Zidovetzki, I. Levitan. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, 1768, 6, 1311–1324.
74. H. J. Yoon, S. B. Jeon, K. Suk, D. K. Choi, Y. J. Hong, E. J. Park. Contribution of TLR2 to the Initiation of Ganglioside-triggered Inflammatory Signaling. *Mol. Cells* **2007**, 25, 1, 99-104
75. H. Ohvo, P. Slotte. Cyclodextrin-Mediated Removal of Sterols from Monolayers: Effects of Sterol Structure and Phospholipids on Desorption Rate. *Biochemistry* **1996**, 35, 8018-8024
76. S. L. Niu, B. J. Litman. Determination of Membrane Cholesterol Partition Coefficient Using a Lipid Vesicle–Cyclodextrin Binary System: Effect of Phospholipid Acyl Chain Unsaturation and Headgroup Composition. *Biophysical Journal* **2002**, 83, 3408–3415

## 1. Introducción general

77. E. G. Doyagüez, J. Rodríguez-Hernández, G. Corrales, A. Fernández-Mayoralas, A. Gallardo. Water-Soluble Pendant Copolymers Bearing Proline and Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin: pH-Dependent Catalytic Nanoreactors. *Macromolecules*. **2012**, 45, 7676–7683
78. E. Vengut-Climent, M. Terrazas, R. Lucas, M. Arévalo-Ruíz, R. Eritja, J. C. Morales. Synthesis, RNAi activity and nuclease-resistant properties of apolar carbohydrates siRNA conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, 23, 14, 4048-4051
79. S. H. Pun, N. C. Bellocq, A. Liu, G. Jensen, T. Machemer, E. Quijano, T. Schluep, S. Wen, H. Engler, J. Heidel, M. E. Davis. Cyclodextrin-Modified Polyethylenimine Polymers for Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2004**, 15, 831-840
80. A. Ruebner, G. L. Statton, M. R. James. Synthesis of a linear polymer with pendent  $\gamma$ -cyclodextrins. *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, 201, 1185–1188.
81. F. Kihara, H. Arima, T. Tsutsumi, F. Hirayama, K. Uekama. In Vitro and In Vivo Gene Transfer by an Optimized  $\gamma$ -Cyclodextrin Conjugate with Polyamidoamine Dendrimer. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 342-350
82. S. J. Hwang, N. C. Bellocq, M. E. Davis. Effects of Structure of  $\beta$ -Cyclodextrin-Containing Polymers on Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2001**, 12, 280-290
83. T. M. Reineke, M. E. Davis. Structural Effects of Carbohydrate-Containing Polycations on Gene Delivery. 2. Charge Center Type. *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 255-261
84. C. Yang, H. Li. S. H. Goh, J. Li. Cationic star polymers consisting of  $\alpha$ -cyclodextrin core and oligoethylenimine arms as nonviral gene delivery vectors. *Biomaterials* **2007**, 28, 3245–3254
85. F. J. Xu, Z. X. Zhang, Y. Ping, J. Li, E. T. Kang, K. G. Neoh. Star-Shaped Cationic Polymers by Atom Transfer Radical Polymerization from  $\gamma$ -Cyclodextrin Cores for Nonviral Gene Delivery. *Biomacromolecules* **2009**, 10, 285–293
86. J. Li, Z. Guo, J. Xin, G. Zhao, H. Xiao, 21-Arm star polymers with different cationic groups based on cyclodextrin core for DNA delivery. *Carbohydrate Polymers* **2009**, 79, 277-283
87. A. U. Bielinska, J. F. Kukowska-Latallo, R. Baker. The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation analysis of alterations induced in nuclease sensitivity, transcriptional activity of the complexed DNA. *Biochim Biophys Acta* **1997**, 1353, 2, 180-90
88. Y. Takakura, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida. Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *J Drug Target* **2002**, 10, 2, 99-104
89. D. L. Elbert, J. A. Hubbell. Surface treatments of polymers for biocompatibility. *Annu Rev Mater Sci* **1996**, 26, 1, 294-365

## **2.Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros**



## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

### 2.1. Introducción

Como se ha mencionado en la **Introducción general** de esta tesis, en este trabajo se han preparado vectores poliméricos de dos componentes portadores de aminas terciarias cationizables y de unidades neutras complementarias (HPMA y derivados glucosídicos). Dichos vectores se han obtenido mediante copolimerización radical convencional de monómeros precursores de dichas unidades, los cuales han sido cuidadosamente elegidos y preparados (en el caso de los derivados glucosídicos en colaboración con un grupo complementario). Es decir, en este estudio el peso del diseño estructural recae en dichos monómeros precursores. Su copolimerización posterior, muy simple, da lugar a copolímeros estadísticos en los que las diferentes unidades se distribuyen a lo largo de la cadena de acuerdo fundamentalmente a su relación molar en alimentación y a la reactividad de los monómeros durante la polimerización.

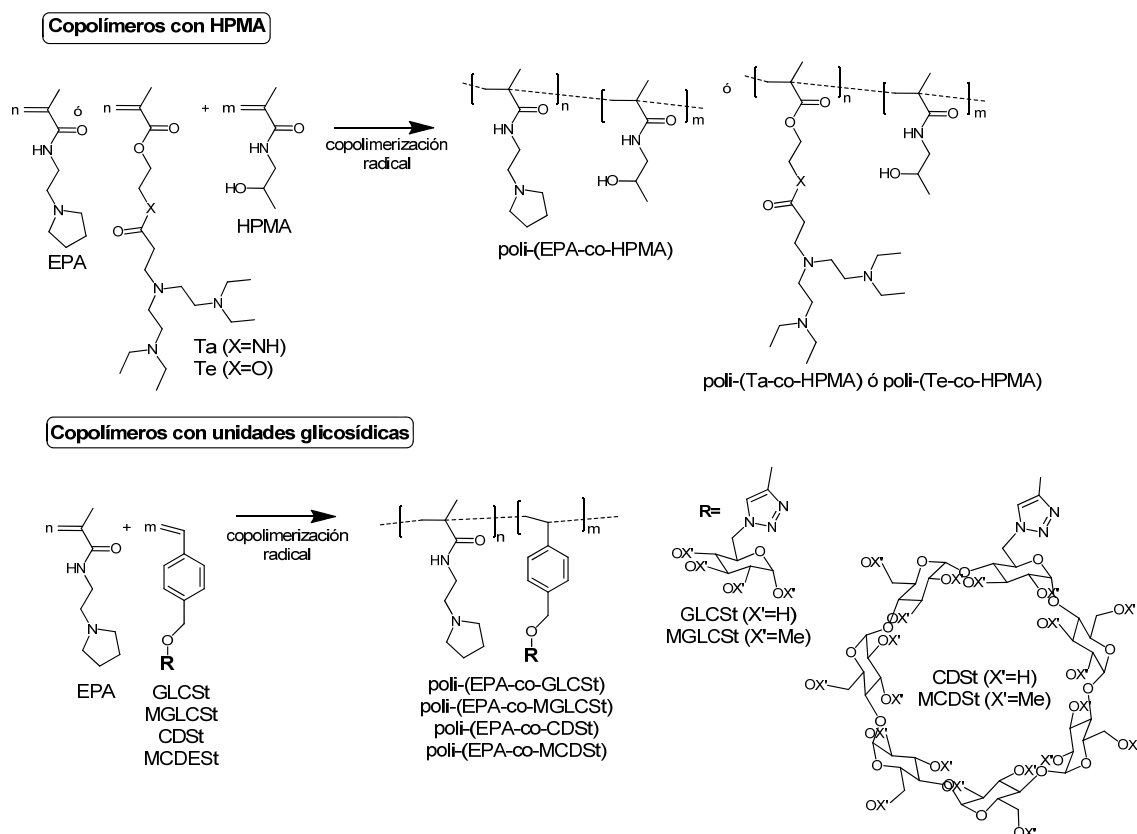
En la **figura 2.1** se muestran los diferentes monómeros precursores así como los procesos de copolimerización y las estructuras copoliméricas preparadas. Se han usado dos tipos de monómeros precursores portadores de aminas terciarias, la metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina, EPA (cuya síntesis ya ha sido descrita previamente por nuestro grupo<sup>1</sup>), y Ta, un derivado metacrílico portador de una triamina dendrítica sintetizado por primera vez en este trabajo. Te es un compuesto análogo, pero hidrolizable, usado comparativamente como se menciona más adelante.

En primer lugar se han preparado y evaluado comparativamente copolímeros de las dos unidades cationizables estables con HPMA, poli(EPA-co-HPMA) y poli(Ta-co-HPMA), utilizando diferentes proporciones molares de cada monómero, así como los correspondientes homopolímeros poli-EPA y poli-Ta. Dada la naturaleza dendrítica de Ta y su alta carga de amina terciaria, se han diseñado relaciones molares de ambos sistemas comparables desde el punto de vista de carga molar de amina. Estos sistemas serán analizados en paralelo con el objetivo de estudiar la influencia que la copolimerización de estas entidades catiónicas con el monómero neutro HPMA posee en las propiedades de estos polímeros, tanto a nivel químico, como su influencia en su capacidad de complejar ADN, su eficiencia de transfección y citocompatibilidad *in vitro*. Al mismo tiempo también se ha sintetizado un derivado portador de la unidad degradable Te que será estudiado comparativamente para evaluar la influencia de la degradación en la actividad. De aquí en adelante, los polímeros portadores de Ta ó Te serán denominados en ocasiones como polímeros dendrónicos.

Por otra parte también se han sintetizado diferentes copolímeros con los monómeros glucosídicos CDSt, MCDSt, GLCSt y MGLCSt, con el objetivo de evaluar estos copolímeros (denominados a partir de ahora como polímeros glucosídicos) como posibles vectores no

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

virales con aplicación en terapia génica, determinando tanto su eficiencia de transfección como su citocompatibilidad. Se ha elegido para este estudio la unidad cationizable EPA debido a su mayor simplicidad estructural, la cual permitirá analizar de forma más sencilla la influencia de las diferentes unidades glucosídicas. El gran volumen de los derivados de CD hace que sus derivados monoméricos se hayan usado en porcentajes molares bajos, siendo las composiciones molares más representativas aquellas que incorporan un 5 y un 10% molar de CD. Para los derivados de glucosa en cambio se han preparado copolímeros en todo el rango de composiciones con el fin de poder hacer un análisis comparativo global.

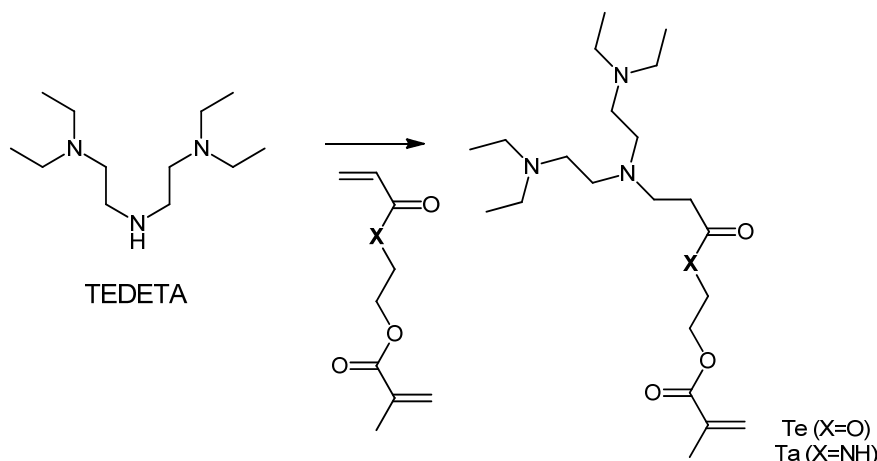


**Figura 2.1.** Esquema de la estructura de los monómeros y de la preparación de los copolímeros estudiados en este trabajo.

La síntesis de EPA y HPMA se ha descrito con anterioridad en la literatura. Los derivados glucosídicos han sido preparados y suministrados por el grupo de Química Orgánica Biológica (QOB) del IQOG-CSIC, un grupo experto en química de azúcares con los que se mantiene una colaboración estable desde hace varios años. De hecho el uso del monómero MCDSt fue descrito por primera vez por nuestro grupo y el mencionado QOB en la preparación de catalizadores derivados de prolina<sup>2</sup>. Los otros monómeros glucosídicos, GLCSt, MGLCSt y CDSt, en cambio, no han sido descritos previamente en la literatura y se han preparado expresamente para este trabajo de tesis. Los derivados Ta y Te son también compuestos inéditos descritos por primera vez en este trabajo, y han sido sintetizados por nuestro grupo. Ambos monómeros (Ta y Te) son derivados metacrílicos de la triamina dendrítica N,N,N',N'-

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

tetraetildietilentriamina (TEDETA), un conocido ligando en ATRP y quelante de metales, que han sido sintetizados mediante una reacción selectiva de adición de Michael sobre entrecruzantes diacrílicos asimétricos (**figura 2.2**). Como se ha mencionado antes, la adición de una amina sobre un grupo acrilato da lugar a un  $\beta$ -amino éster sensible a la hidrólisis en medio acuoso<sup>3-5</sup>, mientras que su adición sobre grupos acrilamida da lugar a un grupo  $\beta$ -amino amida estable. En la **figura 2.2** si  $X=O$ , obtenemos un compuesto hidrolizable, denominado Te en este trabajo, mientras que si  $X=NH$ , obtenemos un compuesto estable en medio acuoso, que hemos denominado Ta.



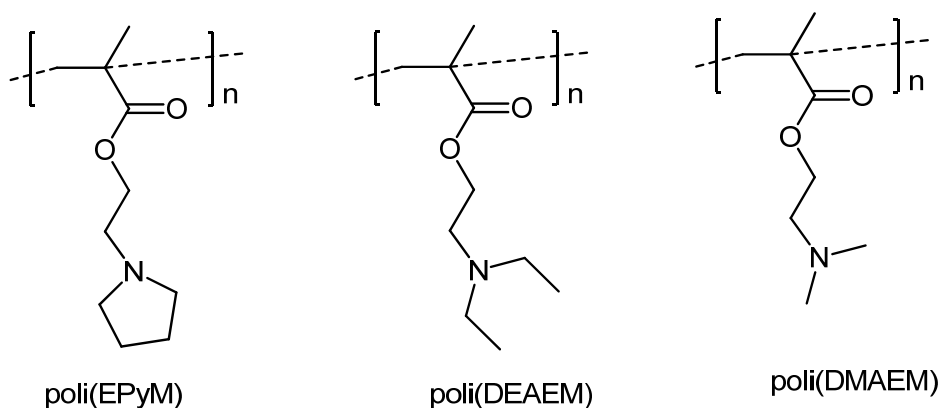
**Figura 2.2.** Representación esquemática de la adición de Michael selectiva de la amina dendrónica N,N,N',N'-tetraetildietilentriamina (TEDETA) sobre dos compuestos diacrílicos asimétricos. Los productos obtenidos han sido denominados Ta en el caso de que  $X=NH$ , siendo este compuesto estable en medio acuoso, mientras que en el caso de que  $X=O$ , el compuesto sensible a la hidrólisis se ha denominado Te.

La estructura dendrítica lateral de Ta y Te puede ser considerada similar a los bloques internos de PEI hiperramificada, el cual es, como se ha comentado en la **Introducción general** uno de los vectores poliméricos con más trayectoria. La naturaleza terciaria de las tres aminas del bloque dendrítico de Ta y Te pueden participar como se ha comentado en el fenómeno de la 'esponja de protones'.

Hay un último aspecto reseñable de los polímeros derivados de estas unidades Ta y Te, y es que han mostrado termosensibilidad tipo *lower critical solution temperature* (LCST) dependiente del pH. Este comportamiento es similar al que se ha descrito para los polímeros derivados del metacrilato de dietilaminoetilo (DEAEM), del metacrilato de dimetilaminoetilo (DMAEM), o del metacrilato de etilpirrolidina (EPyM) (ver **figura 2.3**), unas estructuras más simples pero muy relacionadas pues poseen un bloque de trietilamina o trimetilamina en su estructura, análogo a los de Ta y Te. Estos polímeros derivados de DEAEM, DMAEM o EPyM, a pH igual o superior a su  $pK_a$ , han mostrado poseer una termosensibilidad negativa en agua, disminuyendo su solubilidad en medio acuoso aumentar la temperatura, precipitando cuando

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

alcanzan una temperatura crítica, la LCST. Por debajo de esta LCST las interacciones entre el polímero y el agua están favorecidas, pero al aumentar la temperatura, las interacciones entre las cadenas de polímero se vuelven más intensas, y el sistema se convierte en hidrofóbico. Físicamente esta transición se manifiesta como el paso de una estructura en ovillo, hacia una estructura globular<sup>6-11</sup>. Poli-DEAEM, el polímero estructuralmente más cercano, tiene un  $pK_a$  cercano a 7,5 y un valor de LCST dependiente del pH; habiéndose descrito LCSTs cercanas a 40 °C a pH 7<sup>12-14</sup>.



**Figura 2.3.** Representación esquemática de las unidades repetitivas del poli metacrilato de etilpirrolidina, poli(DMAEM), el polimetacrilato de N,N-dietilaminoetilo, poli(DEAEM), y el polimetacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, poli(DMAEM).

### 2.1.1. Copolimerización radical

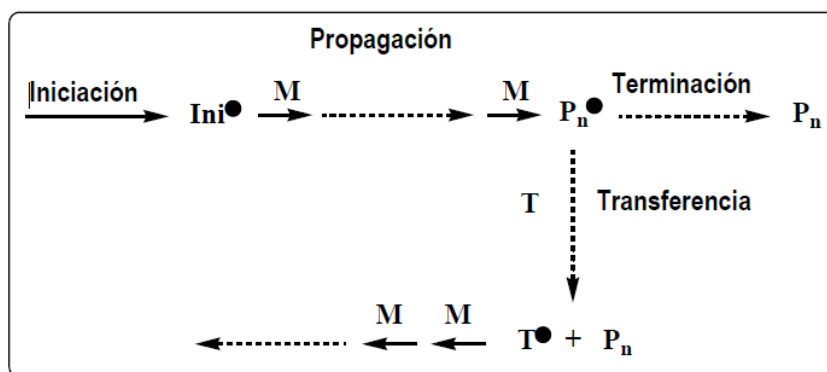
Como se ha mencionado anteriormente, en la presente tesis doctoral se ha abordado la síntesis de los copolímeros de estudio mediante una aproximación '*bottom-up*', en la que se ha aplicado un gran esfuerzo en el diseño y síntesis de monómeros que ofrecieran las propiedades deseadas, y éstos fueron posteriormente copolimerizados en diferentes fracciones molares, mediante un proceso sencillo como es la polimerización radical convencional. Es de destacar que muchos de los monómeros usados en este trabajo, algunos descritos aquí por primera vez, son precursores muy inusuales en química macromolecular debido a su multifuncionalidad (Ta, Te), a su volumen (MCDSt, CDSt) o a su implicación biológica (derivados de glucosa). Estas particularidades en volumen y funcionalidades también pueden tener su implicación en la propia reacción de polimerización radical.

La polimerización radical consiste en una polimerización en cadena en la que las especies activas son radicales libres. Los radicales son moléculas orgánicas que contienen un electrón desapareado y que generalmente se consideran especies inestables y reactivas. Los monómeros sintetizados en esta tesis pertenecen al grupo de los acrílicos, en los que la polimerización se produce por adición al doble enlace que presenta el grupo acrílico.



## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

Entre los diferentes tipos de polimerización en cadena, la polimerización radical convencional es el proceso más utilizado desde el punto de vista de la producción industrial, ya que es una técnica relativamente fácil, que no requiere una purificación exhaustiva de reactivos (excepto la eliminación de oxígeno disuelto) y generalmente da lugar a polímeros de peso molecular suficientemente alto en condiciones relativamente suaves, con temperaturas de polimerización entre ambiente y 200 °C. Se puede aplicar en diferentes procesos como en masa, en disolución, en suspensión o en emulsión. En este trabajo se ha usado la polimerización en disolución para la obtención de los polímeros lineales de estudio.



**Figura 2.4.** Etapas de la polimerización radical, donde  $\text{Ini}\bullet$ =centro activo primario,  $\text{P}_n\bullet$ =centro activo en crecimiento,  $\text{P}_n$ =cadena ‘muerta’ de polímero,  $\text{T}$ =agente de transferencia,  $\text{T}\bullet$ =centro activo en crecimiento tras la transferencia.

El proceso consta de tres etapas: iniciación, propagación y terminación, a las cuales hay que sumar la posibilidad de la reacción de transferencia. Las etapas se resumen en el esquema de la **figura 2.4**. La etapa de iniciación consiste en la rotura homolítica de un iniciador que genera radicales libres por vía térmica, fotoquímica o por reacciones tipo redox. Este proceso necesita de algún tipo de aporte energético, que en este trabajo es de tipo térmico. Estos radicales primarios pueden originar una reacción en cadena, habitualmente rapidísima, en la que se adicionan de forma sucesiva hasta miles de moléculas de monómero, en la etapa denominada propagación. Esta reacción en cadena es la etapa definitoria de la polimerización y tiene lugar hasta que por algún motivo el extremo activo se desactiva, formándose una cadena ‘muerta’ o desactivada que forma parte del material final. Una de las posibilidades de desactivación es mediante reacción birradicalaria de dos macrorradicales, en la llamada etapa de terminación. La reactividad de esta reacción radicalaria es altísima, y por tanto es una desactivación intrínseca a este tipo de polimerización, pues los radicales son los protagonistas de la reacción y deben estar presentes en el medio de reacción<sup>15</sup>.

En esta etapa de terminación los macrorradicales involucrados se desactivan y no se produce ningún otro hecho que influya en la reacción. Hay otra posibilidad de desactivación mecanísticamente muy diferente, la transferencia, en la cual una cadena en crecimiento se desactiva al reaccionar con un compuesto T (agente de transferencia) pero en este caso en el

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

proceso se forma un nuevo radical derivado de T capaz de reiniciar un nuevo proceso de reacción en cadena. Este proceso de transferencia es muy común en polimerización radical convencional y en realidad cualquier especie presente en el medio, como el disolvente o el propio monómero, puede actuar como agente de transferencia. Obviamente, a mayor extensión del proceso de transferencia, menor será el peso molecular final de las cadenas poliméricas<sup>16</sup>.

La mayoría de los sistemas evaluados en este trabajo son copolímeros portadores de dos unidades diferentes, los cuales se han obtenido mediante polimerización radical simultánea de los dos monómeros precursores (**figura 2.5**), es decir, mediante copolimerización. La polimerización simultánea de dos o más monómeros da lugar a copolímeros estadísticos, llamados así porque la distribución de unidades a lo largo del esqueleto macromolecular obedece alguna ley estadística<sup>17</sup> (**figura 2.6**).



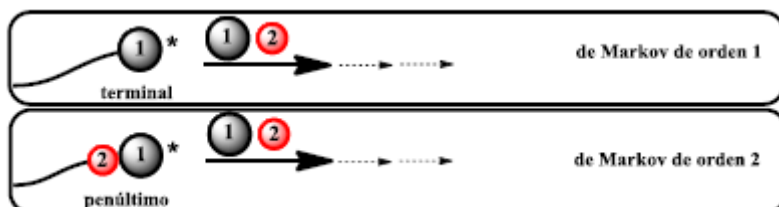
**Figura 2.5.** Representación esquemática de una copolimerización simultánea de dos monómeros y de la formación de una cadena de polímero estadístico.

Esta distribución estadística está relacionada obviamente con el modelo de propagación, es decir, con el modo en que se incorporan los dos componentes a las cadenas durante la propagación. El modelo de propagación históricamente más utilizado ha sido el terminal<sup>18</sup>, que es el que considera que la reactividad del macrorradical en crecimiento depende de la naturaleza de la unidad terminal (**figura 2.6**). Durante muchos años se pensó que la mayoría de las copolimerizaciones binarias se regían adecuadamente por el modelo terminal, a pesar de ciertas discrepancias a la hora de predecir parámetros de velocidad de reacción. Sin embargo, desde los experimentos pioneros de Fukuda en 1985<sup>19</sup> (medida de constantes absolutas), hoy día está aceptado que en la gran mayoría de copolimerizaciones el modelo físicamente válido para explicar la totalidad de la reacción es el penúltimo (**figura 2.6**), el cual considera que la reactividad del macrorradical está definida no sólo por la naturaleza de la unidad terminal, sino también por la de la penúltima. Sin embargo, es un modelo difícil de usar y a nivel composicional la reacción se suele describir adecuadamente usando el modelo terminal. De esta manera, aunque el modelo penúltimo es físicamente válido, se sigue utilizando el terminal para describir composicionalmente la reacción<sup>20</sup>.

Dentro del modelo terminal, si para una copolimerización binaria de 1 y 2 se toma como ejemplo el macrorradical en crecimiento acabado en 1, éste tendrá diferente reactividad hacia cada uno de los dos monómeros. Si es más reactivo hacia 1, significa que será más probable encontrar la secuencia 11 que la 12 en la cadena polimérica. Por tanto, este modelo de propagación da lugar a cadenas cuya distribución de unidades sigue una estadística de Markov

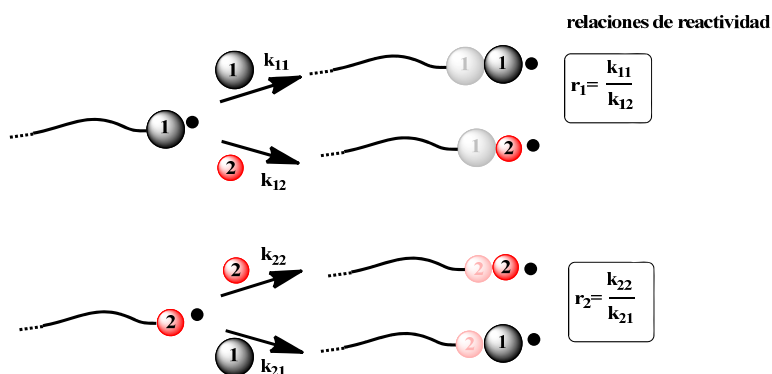
## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

de orden 1: la probabilidad de encontrar una unidad depende de la naturaleza de la unidad vecina. El modelo penúltimo en cambio da lugar a una estadística de Markov de orden 2: la probabilidad de encontrar una unidad depende de la naturaleza de las dos unidades inmediatamente vecinas.



**Figura 2.6.** Esquema de dos tipos de macrorradicales mostrando las unidades terminal y penúltima usadas en los correspondientes modelos.

Ya en 1944 Mayo y Lewis<sup>21</sup> y otros<sup>22</sup> llevaron a cabo simultáneamente un desarrollo cinético básico del modelo terminal para una copolimerización binaria de dos monómeros genéricos 1 y 2, de acuerdo al esquema representado en la **figura 2.7**.



**Figura 2.7.** Posibles reacciones de propagación y relaciones de reactividad según el modelo terminal.

Se definen por tanto dos tipos de macrorradicales, el acabado en 1 y el acabado en 2. Cada uno de ellos tiene una diferente reactividad con los dos monómeros. Hay por tanto cuatro posibles propagaciones, cada una de ellas con su constante característica. Para cada macrorradical se define una '*relación de reactividad*' como la relación de reactividades hacia el monómero homólogo y el heterólogo (homopropagación y propagación cruzada), expresados como la relación de constantes. Así,  $r_1$ , la relación de reactividad del macrorradical acabado en 1, viene dado por  $k_{11}/k_{12}$ . Una  $r_1$  (ó  $r_2$ ) mayor o menor que uno significa que el macrorradical acabado en 1 (ó 2) es más o menos reactivo hacia el monómero homólogo 1 (ó 2) que hacia el heterólogo 2 (ó 1).

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

Se llegó a esta ecuación de composición del modelo terminal (la llamada ecuación de Mayo-Lewis):

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1](r_1[M_1] + [M_2])}{[M_2]([M_1] + r_2[M_2])} \quad (2.1)$$

Donde  $[M_1]$  y  $[M_2]$  son las concentraciones molares de los monómeros 1 y 2. Ésta es una ecuación diferencial que sólo da información de un determinado instante de la reacción. Se puede escribir en forma de fracciones molares:

$$f_1 = \frac{r_1 F_1^2 + F_1(1 - F_1)}{r_1 F_1^2 + 2F_1(1 - F_1) + r_2(1 - F_1)^2} \quad (2.2)$$

Donde  $f_i$ =fracción molar instantánea de  $i$  en el copolímero siendo  $i=1, 2$  ( $f_1+f_2=1$ ),  $F_i$ =fracción molar instantánea de  $i$  en la alimentación ( $F_1+F_2=1$ ) y  $r_1$  y  $r_2$ = relaciones de reactividad de los monómeros 1 y 2 respectivamente. Para un determinado medio de reacción con una mezcla de monómeros dada ( $F_1$ ), la ecuación nos dice –conocidos  $r_1$  y  $r_2$ –, cómo es el copolímero que se forma en ese instante a nivel composicional ( $f_1$ ). La ecuación diferencial 1 se puede integrar obteniéndose una ecuación que ya es capaz de dar información de la evolución de la reacción en función del tiempo o de la conversión:

$$\frac{[M_2]}{[M_2]_0} = \left( \frac{[M_2]_0 [M_1]}{[M_1]_0 [M_2]} \right)^{\frac{r_2}{1-r_2}} \left( \frac{(r_1 - 1) \left( \frac{[M_1]}{[M_2]} \right) - r_2 + 1}{(r_1 - 1) \left( \frac{[M_1]_0}{[M_2]_0} \right) - r_2 + 1} \right)^{\frac{r_1 r_2 - 1}{(1-r_1)(1-r_2)}} \quad (2.3)$$

Donde  $[M_i]_0$  es la concentración del monómero  $i$  (siendo  $i=1,2$ ) a tiempo 0. Esta ecuación puede dar una descripción en función del tiempo y ofrece también datos composicionales promedio del *acumulado* de copolímero, es decir, del conjunto de cadenas formadas hasta una determinada conversión.

El software Copol (desarrollado por el Dr. Alberto Gallardo)<sup>23</sup>, que es el que se ha usado a lo largo de este trabajo para describir las reacciones de copolimerización –conocidas  $r_1$  y  $r_2$ – utiliza esta ecuación integrada para llevar a cabo la predicción en función de la conversión.

En este capítulo se ha llevado a cabo un análisis teórico (usando Copol) de las diferentes copolimerizaciones a partir de relaciones de reactividad de sistemas análogos tomadas de la literatura, con el objetivo de describir de forma aproximada la distribución de unidades a lo largo de las cadenas y su posible relevancia.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

El programa Copol también da información microestructural en términos de fracciones molares de diadas. El modelo terminal permite describir instantáneamente las fracciones molares de cualquier secuencia utilizando las probabilidades condicionales: Las probabilidades condicionales  $p_{ii}$  y  $p_{ij}$  para la adición de los monómeros  $i$  ó  $j$  a una cadena en crecimiento terminada en  $\sim M_i$  ( $i, j=1, 2$ ), vienen dadas por las relaciones de las velocidades de propagación (ecuaciones 2.4 y 2.5):

$$p_{ii} = \frac{R_{ii}}{R_{ii} + R_{ij}} = \frac{k_{ii}[M_i]}{k_{ii}[M_i] + k_{ij}[M_j]} = \frac{r_i}{r_i + [M_j]/[M_i]} \quad (2.4)$$

$$p_{ij} = 1 - p_{ii} \quad (2.5)$$

donde  $[M_1]$  y  $[M_2]$  son las concentraciones de monómero en la alimentación. Además la fracción molar instantánea de cualquier secuencia es igual a la probabilidad de que exista la primera unidad ( $f_i$ , fracción molar en el copolímero) multiplicada por la correspondiente probabilidad condicional. Por ejemplo, la fracción molar de las diadas basadas en  $i$  sería (ecuaciones 2.6 y 2.7):

$$F_{ii} = f_i p_{ii} \quad (2.6)$$

$$F_{ij+ji} = 2 f_i p_{ij} \quad (2.7)$$

La fracción molar de la secuencia está relacionada con la población de la secuencia y por lo tanto con la microestructura (distribución de secuencias). El programa Copol hace una aproximación a conversión 100% de la fracción molar acumulada utilizando una integración numérica simple de los datos instantáneos.

## 2.2. Materiales y métodos

### 2.2.1 Reactivos

1-amino-2-propanol (Aldrich), 2-aminoetanol (Aldrich), 2-(metilamino)etanol (Aldrich), nitrobenzoxadiazol (Aldrich), cloruro de acrilóilo (Aldrich), N-(2-aminoetil) pirrolidina (ABCR), dietilamina (Aldrich) y trietilamina (Scharlau) fueron utilizados sin purificación previa. El iniciador radicalario AIBN (2,2'-azobisisobutironitrilo) (Fluka), fue recrystalizado en metanol. Cloruro de metacrilóilo (Fluka), cloruro de acrilóilo (Aldrich) y metacrilato de 2-hidroxietilo, HEMA (Aldrich), fueron destilados justo antes de su utilización.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

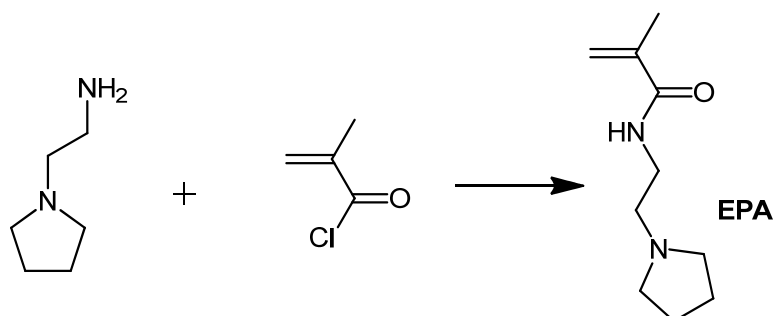
### 2.2.2 Síntesis de intermedios y monómeros

En este apartado se detalla la síntesis de los monómeros sintetizados y estudiados para este trabajo, así como la asignación de las señales obtenidas tras su análisis mediante RMN de protón. Los correspondientes espectros de RMN se muestran en el **Anexo** de la presente tesis doctoral.

#### Metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina (EPA)

Para la obtención de este monómero catiónico, siguiendo el protocolo desarrollado por D. Velasco *et al.*<sup>1</sup> se disolvieron 44 mmoles de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina y 44 mmol de trietilamina, en 40 mL de cloroformo. A esta disolución, se le añadió mediante goteo con un embudo de adición, una disolución de 48 mmoles de cloruro de metacrililo en 10 mL de cloroformo seco. Todo este proceso se llevó a cabo en atmósfera inerte a 0 °C, y la reacción fue mantenida en estas condiciones durante 6 horas. Posteriormente se llevó a cabo el lavado de la mezcla, utilizando H<sub>2</sub>O y una disolución de NaOH (5% p/v) alternativamente. A continuación se añadió sulfato de magnesio anhidro, y se mantuvo la mezcla en refrigeración 24 horas. Finalmente se realizó un filtrado por gravedad, y el disolvente fue eliminado mediante presión reducida, obteniendo el monómero con un rendimiento cercano al 70%..

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz)  $\delta$ : 5,70 (s, 1H), 5,44 (s, 1H), 3,41 (t, 2H, J=6 Hz), 2,67 (t, 2H, J=6 Hz), 2,58 (m, 4H), 1,92 (s, 3H), 1,77 (m, 4H)



**Figura 2.8.** Síntesis de la metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina (EPA).

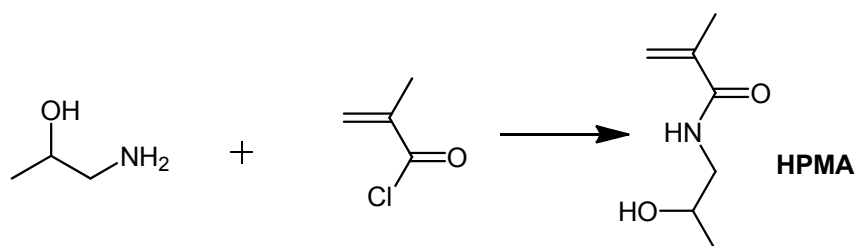
#### Metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo) (HPMA)

Para la síntesis de este monómero se siguió el protocolo de K. Ulbrich *et al.*<sup>24</sup>, con pequeñas modificaciones. A una disolución de 66 mmoles de 1-amino-2-propanol y carbonato sódico anhidro (en saturación), en diclorometano, se le añadieron, mediante un embudo de adición y en baño de hielo, 66 mmoles de cloruro de metacrililo, previamente disuelto en 10 mL de diclorometano. La finalidad de la adición del carbonato sódico fue obtener un medio básico, para favorecer la reactividad del grupo amino, frente al grupo hidroxilo, obteniendo de

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

esta forma el producto deseado. Tras finalizar la adición, la mezcla obtenida se mantuvo a 15 °C, en atmósfera inerte y con agitación, durante 24 horas. Posteriormente la mezcla de reacción fue filtrada, y parte del disolvente fue eliminado mediante evaporación a presión reducida, dejando el producto disuelto en aproximadamente la mitad del volumen inicial. La muestra obtenida fue guardada a -20 °C durante 48 horas, para conseguir su cristalización, y el disolvente fue eliminado mediante filtración a vacío. El producto final fue obtenido con un rendimiento cercano al 60%.

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O, 300 MHz) δ: 5,71 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,29 (m, 2H), 1,94 (s, 3H), 1,18 (d, 3H, J=6 Hz).



**Figura 2.9.** Síntesis de la metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo) (HPMA).

### Metacrilato de 2-(acriloilamino)etilo (AAEMA)

Para la síntesis de este compuesto se siguió el protocolo de D. Demirgoz *et al*<sup>25</sup>. El compuesto fue sintetizado en dos pasos. En el primero se disolvieron 20 mmol de hidrocloreto de 2-aminoetanol en 200 mL de acetonitrilo. Tras la adición de 200 mg de hidroquinona como inhibidor, se añadieron 20 mmol de cloruro de metacrililo a la mezcla, que fue calentada durante 2 horas a reflujo. Tras enfriar, el precipitado blanco, correspondiente a la sal que no ha reaccionado, fue eliminado por filtración. El filtrado fue secado a presión reducida y usado, sin ninguna purificación adicional, en el siguiente paso. El rendimiento obtenido en este paso fue del 45%.

A continuación, este producto fue disuelto en 300 mL de cloroformo y enfriado hasta alcanzar 0 °C. En atmósfera inerte, una cantidad equimolar de cloruro de acrililo y el doble de moles de trietilamina fueron añadidos, y la mezcla de reacción fue atemperada hasta alcanzar temperatura ambiente. Tras 3 horas de reacción, la fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio anhidro, y el disolvente fue eliminado a presión reducida. La purificación del producto fue llevada a cabo mediante una columna de cromatografía usando gel de sílice y diclorometano como eluyente. El rendimiento final fue cercano al 91%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,26 (d, 1H, J=15 Hz), 6,15-6,06 (m, 2H), 5,66-5,57 (m, 2H), 4,26 (t, 2H, J=5,1 Hz), 3,63 (q, 2H, J=5,1 Hz), 1,92 (s, 3H)



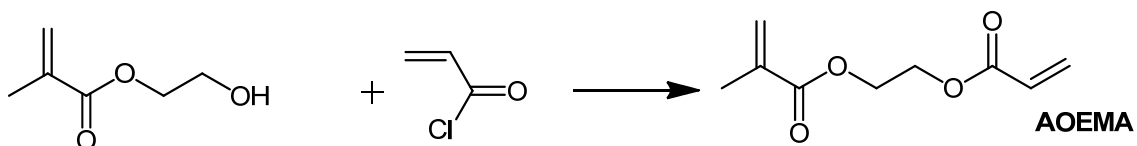


## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

mmol) de cloruro de acrilóilo, disuelto en 5 mL de cloroformo. La adición fue realizada a 0 °C, manteniendo la reacción durante 24 horas a temperatura ambiente

Para purificar este producto, se disolvió en un volumen mayor de cloroformo, y la fase orgánica fue lavada dos veces con una disolución acuosa (5% p/v) de NaOH. Posteriormente la fase orgánica fue secada con sulfato de magnesio anhidro y el disolvente se eliminó a vacío. Se obtuvo un rendimiento superior al 90%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,43 (d, 1H, J=9 Hz), 6,20-6,05 (m, 2H), 5,86 (d, 1H, J=12 Hz), 5,59 (s, 1H), 4,39 (s, 4H), 1,94 (s, 3H)

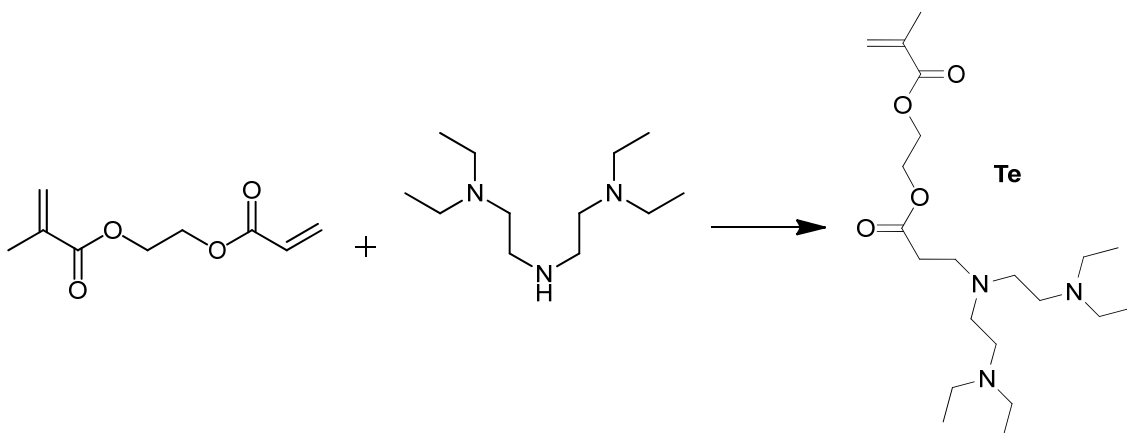


**Figura 2.12.** Síntesis del entrecruzante diacrílico asimétrico AOEMA.

### Metacrilato de 2-((3-(Bis(2-(dietilamino)etil)amino)propanoil)oxi)etilo (Te)

Para la síntesis de este monómero se disolvieron 1,4 mmol de AOEMA en 5 mL de cloroformo. A la mezcla de reacción se añadió una cantidad catalítica de ácido acético e hidroquinona como inhibidor radicalario. A continuación se añadió gota a gota una cantidad equimolar de TEDETA. La reacción fue mantenida a 40 °C en agitación durante 48 horas. La reacción fue cuantitativa y el producto final fue utilizado sin ninguna purificación adicional. Se obtuvo un rendimiento superior al 90%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,14 (s, 1H), 5,59 (s, 1H), 4,28 (t, 2H, J=4,5 Hz), 3,86 (t, 2H, J=4,5 Hz), 2,82 (t, 2H, J=7,2 Hz), 2,57-2,43 (m, 18H), 1,95 (s, 3H), 1,04-0,98 (m, 12H).



**Figura 2.13.** Síntesis del monómero metacrílico denominado Te.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

### Metacrilato de 2-((3-(dietilamino)propanoilo)oxi)etilo (Te-modelo)

Para la síntesis de este monómero se usó la receta del compuesto anterior Te, utilizando dietilamina en lugar de la amina dendrítica TEDETA. El rendimiento de la reacción fue superior al 90%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,11 (s, 1H), 5,57 (s, 1H), 4,26 (m, 4H), 2,74-2,69 (m, 2H), 2,59-2,47 (m, 6H), 1,89 (s, 3H), 1,08-0,86 (m, 6H)

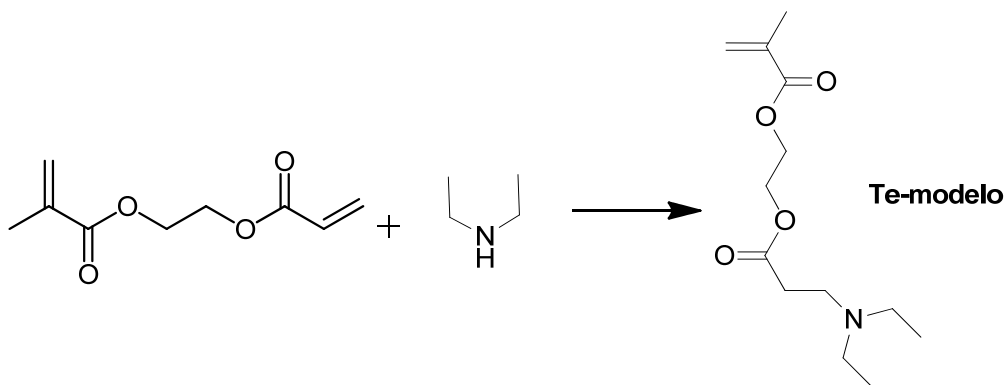


Figura 2.14. Síntesis del monómero metacrílico denominado Te-modelo.

### Monómeros derivados de α-glucosa y β-ciclodextrina

Estos monómeros fueron suministrados por el grupo de Química Orgánica Biológica, del Instituto de Química Orgánica General (IQOG) del CSIC, con el que se colabora en este tema. En el **Anexo** se detalla la ruta de síntesis así como la correspondiente caracterización de cada uno de estos monómeros.

#### 2.2.3 Polimerizaciones

Las homo- y copolimerizaciones fueron llevadas a cabo mediante polimerización radical a 60 °C, utilizando AIBN ( $[I] = 1,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ) como iniciador radical y una  $[\text{Monómero}]_{\text{total}} = 1 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizando los siguientes disolventes: isopropanol para los copolímeros poli(EPA-co-HPMA), agua/isopropanol (60:40) para la homopolimerización de EPA, mezcla DMF/DMSO (50:50) para los copolímeros poli(EPA-co-CDSt), y DMF para el resto. Para cada pareja copolimérica se prepararon diferentes composiciones tal y como se indica en el apartado de **Resultados y discusión** así como los correspondientes homopolímeros. Todas las polimerizaciones fueron realizadas en atmósfera de N<sub>2</sub> libre de oxígeno. Transcurridas 24 horas, la mezcla de reacción fue purificada mediante diálisis en agua, usando membranas Spectra/Por® (Spectrum Laboratories Inc.) con un peso molecular de corte de 3,5 kDa. Finalmente el agua fue eliminada mediante liofilización.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

### 2.2.4 Métodos

Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  se realizaron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-300 en  $\text{D}_2\text{O}$  o  $\text{CDCl}_3$  con TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos se dan en escala  $\delta$  relativos a TMS. La composición se determinó por la intensidad relativa de las integrales de las unidades de repetición de los copolímeros.

Se monitorizó la degradación del copolímero poli(Te-co-HPMA) a diferentes valores de pH mediante RMN ARRAY dinámico. Los experimentos se llevaron a cabo en un espectrómetro Varian 400. Para la cuantificación de los experimentos se siguieron las condiciones descritas en trabajos anteriores<sup>27</sup>: se aplicó una secuencia de pulsos de 7  $\mu\text{s}$  equivalente a un ángulo de  $90^\circ$  y 120 segundos de tiempo de retardo para asegurar que se permite la relajación total de los protones y poder procesar los datos individuales. La velocidad de giro de las muestras fue de 7 Hz y por cada dato se realizó una única adquisición (FID),  $n_t=1$ , para asegurar que la medida corresponde a la composición/conversión instantánea y no a una media. La muestra se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  utilizando el controlador de temperatura del equipo de resonancia. Los medios deuterados se prepararon disolviendo las mezclas de sales obtenidas por liofilización del tampón acuoso correspondiente, en  $\text{D}_2\text{O}$ .

La LCST se determinó midiendo la transmitancia óptica de las disoluciones de copolímeros en el tampón acuoso correspondiente a 500 nm en función de la temperatura. Se usaron disoluciones de polímero de 2 mg/mL en agua destilada. El análisis se realizó en un espectrómetro UV-visible Cary 3 BIO-Varian (Varian Medical Systems Inc.). La temperatura se fue aumentando desde  $25^\circ\text{C}$  hasta un máximo de  $90^\circ\text{C}$  a una velocidad de  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . Al comprobarse que los resultados de los sistemas poli(Ta-co-HPMA) ofrecieron resultados muy similares al realizar las medidas a 1 y  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , se usó esta última velocidad de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  para el sistema poli(Te-co-HPMA) con el fin de minimizar la influencia de la degradación. La LCST se estimó como la temperatura en el punto de inflexión de la curva de absorbancia frente a temperatura.

El peso molecular de los polímeros fue determinado por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) en un cromatógrafo Perkin Elmer con bomba isocrática conectada a un detector diferencial difractométrico (serial 200 a). Se acondicionaron las dos columnas a  $70^\circ\text{C}$  y se utilizó como eluyente para las muestras (3 mg/mL) DMF grado HPLC suplementado con un 0,1% v/v de LiBr a 0,3 mL/min. El calibrado se realizó con patrones monodispersos de polimetacrilato de metilo en el rango de  $2,9 \times 10^3$  a  $480 \times 10^3$  Da proporcionados por Scharlab.

Los valores de las constantes de ionización ( $\text{pK}_a$ ) del homopolímero poli-EPA, así como de los polímeros poli(EPA-co-HPMA) fueron determinados mediante valoraciones ácido-base de disoluciones 100 mg de polímero en 25 mL de una disolución acuosa de NaCl al 0,1 M. Se

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

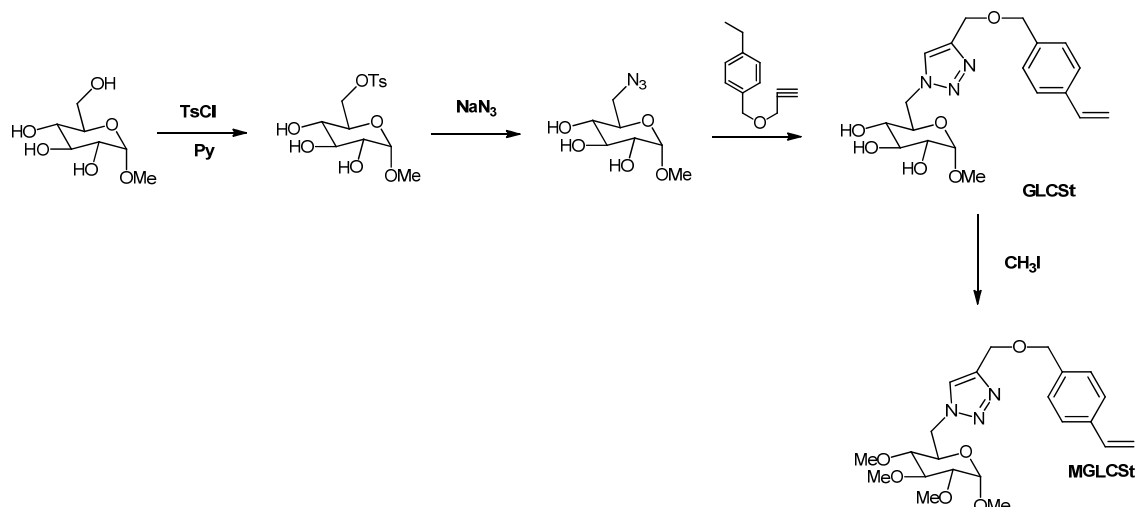
utilizó una disolución acuosa diluida de NaOH 0,01 M para poder completar la valoración con pequeños volúmenes y así no variar significativamente la fuerza iónica de las disoluciones. Se añadieron 1-3 mL de una disolución HCl 0,1 N para asegurar la completa ionización de los grupos amino. Los cambios de pH se midieron con un pH-metro Schott (Schott Instruments).

Los valores de  $pK_a$  de los polímeros derivados de Ta fueron determinados de un modo similar al anteriormente descrito, mediante valoración ácido-base. Sin embargo, en este caso se utilizaron disoluciones de 5 mg de polímero en 5 mL de una disolución acuosa de NaCl 0,15 M. Tras añadir un pequeño volumen de HCl 1 M, la valoración se llevó a cabo añadiendo pequeños volúmenes de una disolución acuosa de NaOH 0,2 M. Las medidas fueron también realizadas con un pH-metro Schott.

### 2.3. Resultados y discusión

#### 2.3.1 Síntesis de monómeros

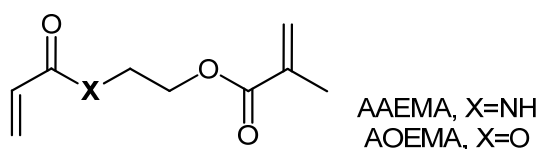
Como se ha mencionado antes, EPA y HPMA se han preparado de acuerdo a la literatura. En el **Anexo** se muestran espectros de RMN de protón de los mismos. Así mismo los derivados estirénicos portadores de unidades glucosídicas GLCSt, MGLCSt, CDSt y MCDSt, fueron preparados y suministrados por el grupo de Química Orgánica Biológica del IQOG. En el **Anexo** se ofrecen todos los detalles de la síntesis y caracterización de los mismos. Se puede observar que se ha usado química click (una ciclación Huisgen azida-alquino catalizada por cobre) para anclar glicósidos derivatizados con una azida a una unidad estirénica polimerizable que porta un alquino, tal y como se muestra en la **figura 2.15** para los derivados de glucosa a modo de ejemplo. La metilación del resto de grupos hidroxilo de la unidad glucídica se llevó a cabo con yoduro de metilo.



**Figura 2.15.** Ruta sintética usada por el Grupo de Química Orgánica Biológica del IQOG para preparar los monómeros glucosídicos. Se muestran los derivados de glucosa como ejemplo.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

El aspecto más novedoso de esta tesis desde el punto de vista de síntesis de monómeros es la preparación de Ta y Te, ya que esta ruta de adición de Michael selectiva sobre entrecruzantes asimétricos para obtener nuevos metacrilatos polimerizables no ha sido descrita previamente en la literatura. Esta ruta se basa en el hecho bien conocido de que los acrilatos y acrilamidas son mejores aceptores de Michael que los metacrilatos, y aceptan nucleófilos más débiles, como aminas o tioles<sup>27-31</sup>. Debido a estas diferencias, en este trabajo se han creado unas condiciones de reacción que permiten realizar una adición de Michael selectiva de aminas sobre sistemas asimétricos metacrilato-R-acrilato o metacrilato-R'-acrilamida, creando de este modo una nueva y versátil ruta para preparar nuevos monómeros metacrílicos. En concreto se ha trabajado con la estructura de la **figura 2.16**, que posee un espaciador etilénico entre los dos grupos polimerizables. Ninguno de los dos compuestos (X=O ó X=NH) es comercial, pero su síntesis ha sido descrita previamente en la literatura<sup>25-26</sup>. Además, nuestro grupo de trabajo tenía experiencia previa en la síntesis de 2-(acrilóilamino)-etil metacrilato (AOEMA, X=NH) ya que fue usado como entrecruzante asimétrico para obtener redes con tendencia a corredes con propiedades mejoradas<sup>25</sup>.



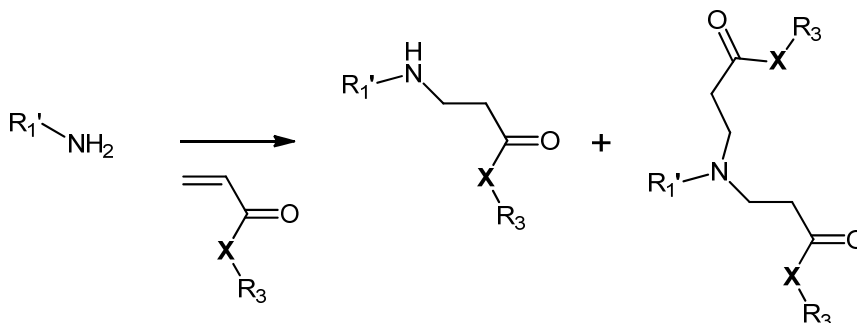
**Figura 2.16.** Estructura química de los dos entrecruzantes asimétricos utilizados en este trabajo como precursores en la síntesis de los monómeros Ta y Te.

Por tanto Ta y Te se han obtenido mediante la adición de Michael selectiva de TEDETA sobre los dos entrecruzantes asimétricos de la **figura 2.16**. Hay varios aspectos a considerar en esta síntesis. En primer lugar la adición sobre acrilatos es más rápida que sobre acrilamidas, por lo que la primera se ha podido llevar a cabo en condiciones más suaves y de forma totalmente selectiva y cuantitativa, mientras que la segunda ha requerido temperaturas altas como 100 °C con conversiones algo inferiores al 90% y una pequeña formación de productos secundarios derivados de la adición al metacrilato. Por ello, Ta ha requerido purificación por columna. Esta purificación no es trivial, probablemente debido a la naturaleza de la amina TEDETA. El uso de gel de sílice convencional no permite la separación del producto y eventuales restos de amina que no hayan reaccionado. Además se merma el rendimiento del producto obtenido debido a su alta afinidad a la matriz cromatográfica. Una alternativa la ofrecen geles de alúmina que, una vez desactivado con agua al nivel Brockmann II, permiten la obtención del producto puro.

En segundo lugar, hay que destacar que la naturaleza de amina secundaria de TEDETA ha facilitado esta ruta en el sentido de que el uso de aminas primarias podría dar

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

lugar a productos disustituídos (ver esquema de la **figura 2.17**) pues se considera que las aminas secundarias son más reactivas en esta reacción que las primarias<sup>32</sup>.

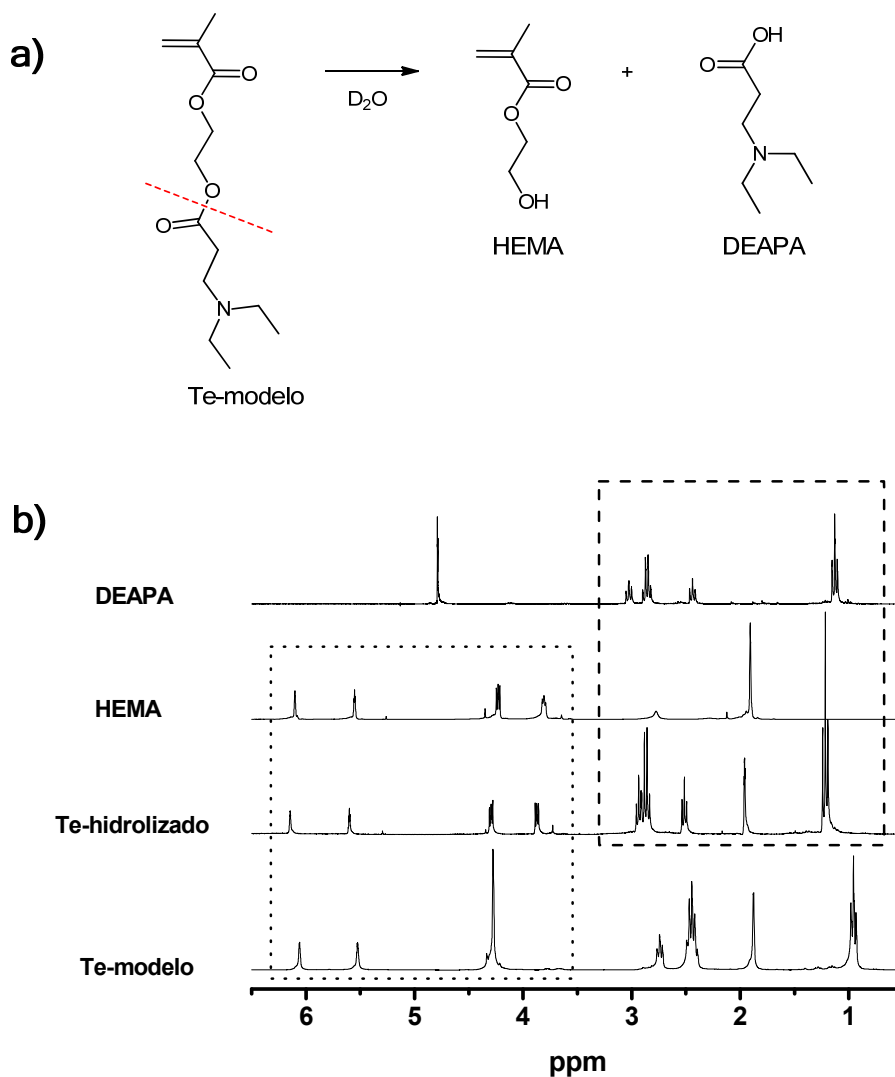


**Figura 2.17.** Representación esquemática de la adición de una amina primaria sobre un grupo acrilato, dando lugar a la formación de un producto disustituído.

En tercer lugar y último, y tal y como se ha mencionado en la introducción, la adición de una amina sobre un grupo acrilato da lugar a un  $\beta$ -amino éster, que es lábil. De hecho, la síntesis del éster no puede ser llevada a cabo en metanol porque se produce transesterificación. En un contexto biológico, la relevancia de esta activación reside en que este  $\beta$ -amino éster es sensible a la hidrólisis en medio acuoso, tal y como ha sido descrito en la literatura<sup>33-35</sup>. En cambio, su adición sobre grupos acrilamida da lugar a un grupo  $\beta$ -amino amida estable. En la **figura 2.18** se muestra este carácter degradable en un monómero más simple obtenido usando dietilamina como amina secundaria modelo. Aunque este experimento se ha llevado a cabo disolviendo simplemente el monómero Te-modelo en agua deuterada con carbonato durante 24 horas, en realidad la sensibilidad hidrolítica es lógicamente dependiente del pH, tal y como se muestra más adelante al estudiar un copolímero portador de Te.

Esta sensibilidad acentuada de los  $\beta$ -amino ésteres puede ser una oportunidad en química de polímeros. Así, ha sido usada por ejemplo para preparar poliésteres degradables autodestructuibles, los cuales han sido evaluados en terapia génica<sup>36</sup>. Se considera que esta sensibilidad, anómala si la comparamos con otros ésteres alifáticos, se debe precisamente a una activación por la amina en posición beta. En este trabajo se ha preparado un copolímero con Te, y se ha evaluado su degradabilidad *in vitro* en función del pH así como su funcionalidad como vector en terapia génica comparativamente a un copolímero similar de Ta con el fin de analizar la posible influencia de la degradación.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

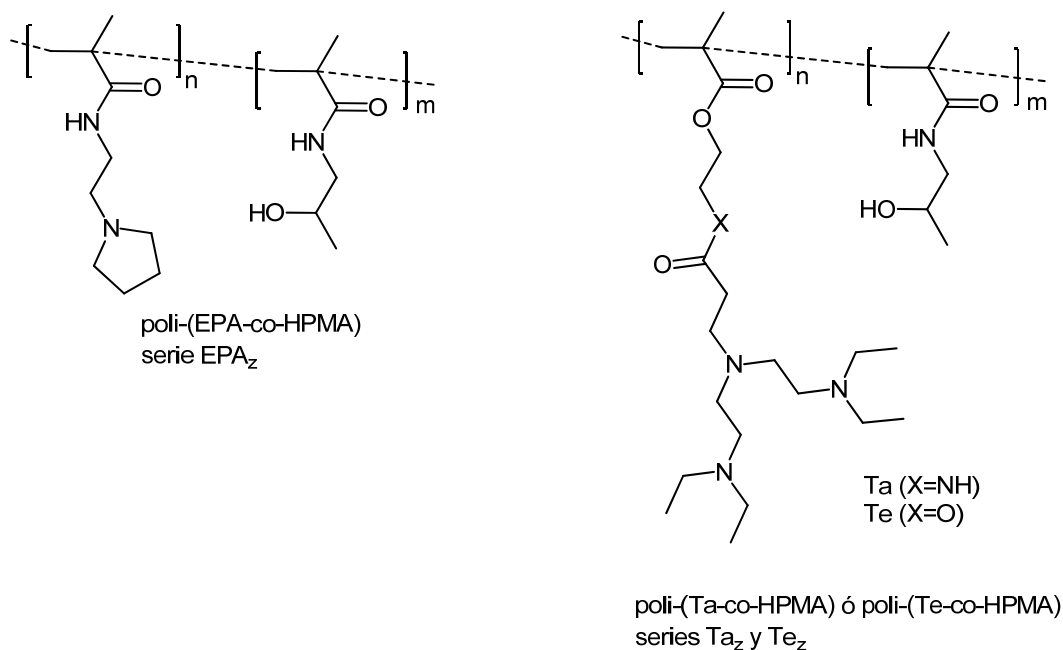


**Figura 2.18.** a) Representación esquemática de la hidrólisis experimentada por el Te-modelo en medio acuoso. b) Espectros de RMN- $^1\text{H}$  del Te-modelo y de sus productos de degradación: metacrilato de hidroxietilo (EPA) y ácido 3-dietilaminopropanoico (DEAPA).

### 2.3.2. Síntesis y caracterización de copolímeros con HPMA

En las **tablas 2.1** y **2.2** se muestran las características composicionales de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) y poli(Ta-co-HPMA), cuyas estructuras se han representado de nuevo en la **figura 2.19**. Se han utilizado los acrónimos EPA<sub>z</sub>, Ta<sub>z</sub> y Te<sub>z</sub> para denominar a los copolímeros poli(EPA-co-HPMA), poli(Ta-co-HPMA) y poli(Te-co-HPMA) respectivamente, siendo Z el tanto por ciento molar nominal de EPA, Ta ó Te.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros



**Figura 2.19.** Estructura química de los diferentes copolímeros poli(EPA-co-HPMA) y poli(Ta-co-HPMA) sintetizados, caracterizados y estudiados en la presente tesis doctoral.

**Tabla 2.1.** Fracciones molares de los comonómeros, comonómeros, tanto en alimentación (F) como en el copolímero final (f), además de los pesos moleculares (Da) y valor de polidispersidad del homopolímero EPA<sub>100</sub> y de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA).

	F <sub>EPA</sub>	f <sub>EPA</sub>	Mw	Mn	Mw/Mn
EPA <sub>100</sub>	1	1	120.000	48.000	2,5
EPA <sub>90</sub>	0,90	0,86	8.000	6.000	1,3
EPA <sub>70</sub>	0,70	0,73	25.000	14.500	1,8
EPA <sub>50</sub>	0,50	0,47	30.000	18.000	1,7
EPA <sub>30</sub>	0,30	0,29	35.000	26.000	1,3
EPA <sub>10</sub>	0,10	0,14	44.000	29.000	1,5

**Tabla 2.2.** Datos, composicionales (F y f), pesos moleculares (Da) y valor de polidispersidad del homopolímero Ta<sub>100</sub> y de los copolímeros poli(Ta-co-HPMA) y poli(Te-co-HPMA). Los GPCs se han llevado a cabo sobre polímeros hidrolizados como se indica en el texto. Además, en esta tabla se han representado los valores de LCST (°C) de cada polímero a pH 8 y pH 9.

	F <sub>Ta</sub>	f <sub>Ta</sub>	Carga molar amina (nominal)	Mw	Mn	Mw/Mn	LCST	
							pH 9	pH 8
Ta <sub>100</sub>	1	1	1	6.100	5.100	1,20	56	68
Ta <sub>75</sub>	0,75	0,69	0,90	8.200	6.500	1,26	65	72
Ta <sub>46</sub>	0,46	0,43	0,70	7.900	7.100	1,10	58	71
Ta <sub>25</sub>	0,25	0,25	0,50	13.800	11.100	1,24	67	86
Te <sub>46</sub>	0,46	0,42	0,70	16.200	9.100	1,78	54	74



## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

En las **figuras 2.20 y 2.21** se muestran espectros de RMN de protón de algunos de los copolímeros obtenidos a alta conversión (seleccionados como ejemplo), así como de los homopolímeros usados como referencia. En ellas se observa cómo al ir cambiando la composición, observamos distintas intensidades en las señales asignadas a cada uno de los monómeros implicados, aumentando o disminuyendo éstas en función del aumento o disminución de la fracción molar del correspondiente monómero en la alimentación del copolímero.

En el caso del sistema EPA-HPMA, este fenómeno es evidente, por ejemplo, en la señal obtenida a 3,8 ppm, correspondiente al grupo  $>CH-$ , presente únicamente en el monómero HPMA, cuya señal va aumentando según aumenta la fracción molar de éste en el copolímero. Observamos este mismo fenómeno también con los grupos  $CH_3$  terminales de la cadena lateral del monómero HPMA, que aparecen como una señal intensa 1,1 ppm solapada con los picos desdoblados de los  $\alpha-CH_3$  de cadena de ambas unidades. El fenómeno contrario puede observarse a 2,6 ppm, donde los protones observados corresponden únicamente al monómero EPA (protones  $N-CH_2$ ), cuya intensidad va disminuyendo. A partir del análisis de las integrales de estos espectros se han podido determinar las composiciones de ambas unidades. Para este cálculo se utilizaron las señales con desplazamiento químico a 3,81 ppm (1 protón de HPMA correspondiente al  $-O-CH<$ ) y el intervalo 2,31 -0,50 ppm en que se incluyen 9 protones de EPA ( $\beta-CH_2$ ,  $CH_2-CH_2-$  del anillo y el  $\alpha-CH_3$ ) y 8 de HPMA ( $(\beta-CH_2, -CH_3$  de la cadena lateral y el  $\alpha-CH_3$ ). Las correspondientes fracciones molares en el copolímero se calcularon para cada caso resolviendo el sistema de dos ecuaciones que se muestran a continuación:

$$A_{2.31-0.50} = 9H_{EPA} + 8H_{HPMA} \quad (2.8)$$

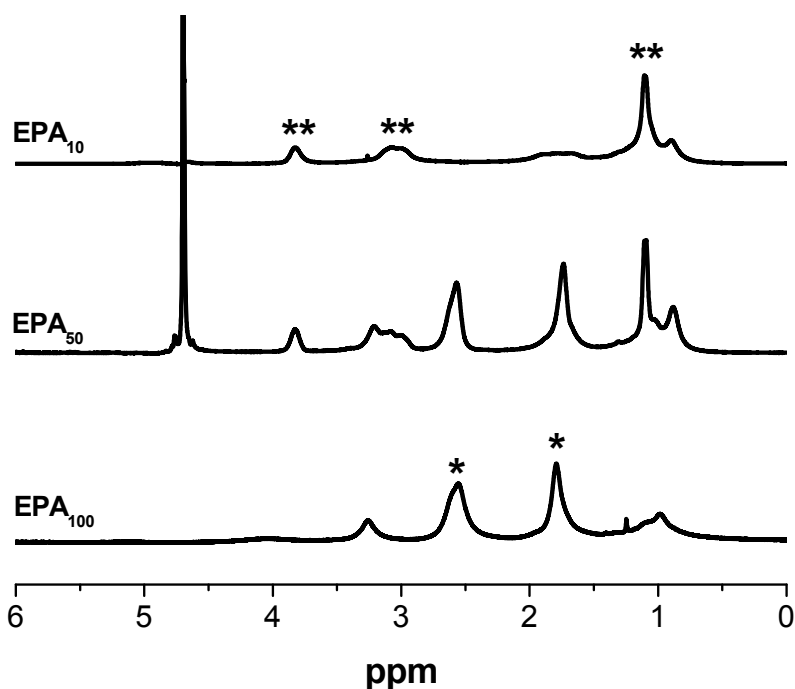
$$A_{3.81} = H_{HPMA} \quad (2.9)$$

Ya que

$$f_{EPA} = \frac{H_{EPA}}{H_{EPA} + H_{HPMA}} \quad (2.10)$$

Siendo A el área de la integral de la correspondiente región obtenida con el programa MestreNova<sup>®</sup> 6. Se han obtenido los valores de  $f_{EPA}$  recogidos en la **tabla 2.1**.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros



**Figura 2.20.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  del homopolímero EPA<sub>100</sub> y de dos de los de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) estudiados. Las señales marcadas con (\*) están asignadas al monómero EPA, mientras que las asignadas al monómero HPMA aparecen señaladas como (\*\*).

Se puede observar que las fracciones molares de estos copolímeros obtenidos a alta conversión son cercanas (dentro de los límites de error de la técnica) a las de alimentación inicial, lo cual confirma que, para cada sistema, ambas unidades se incorporan adecuadamente a las cadenas copoliméricas.

En el caso del sistema Ta-HPMA, el gran volumen de la unidad Ta hace que los cambios en los espectros sean más sutiles y más difíciles de percibir. En los espectros de la **figura 2.21** se observa que aparecen los mismos picos del HPMA que se han mencionado antes, el  $-\text{O}-\text{CH}<$  a 3,8 ppm y el  $\text{CH}_3$  lateral a 1,1 ppm aunque con un gran solapamiento con las señales de Ta (ó Te). Hay que destacar que la gran cantidad de protones  $-\text{CH}_3$  y  $\text{N}-\text{CH}_2-$  presentes en esta unidad Ta hace que haya siempre dos señales predominantes muy intensas centradas en 3,0 y 2,6 ppm incluso para relaciones molares de Ta de 0,25. Por ello, con el objetivo de obtener datos con cierta confianza, en este caso el análisis composicional se ha llevado a cabo comparando dos amplias regiones del espectro entre 4,0-2,2 y 2,2-0,1 ppm. La región entre 4,0 y 2,2 ppm incluye 24 protones de Ta ó Te (todos los  $-\text{CH}_2-$  excepto el  $\beta\text{-CH}_2$ ) más 3 de HPMA (el  $-\text{O}-\text{CH}<$  y los  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ), mientras que la región entre 2,2 y 0,1 ppm recoge las áreas de los picos correspondientes a 17 protones de Ta ó Te (los 5 grupos  $\text{CH}_3$  incluido el  $\alpha\text{-CH}_3$  más el  $\beta\text{-CH}_2$ ) más 8 de HPMA (los dos  $\text{CH}_3$  incluido el  $\alpha\text{-CH}_3$  más el  $\beta\text{-CH}_2$ ). Es decir, se ha resuelto en cada caso este sistema de dos ecuaciones (válido también para Te):

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

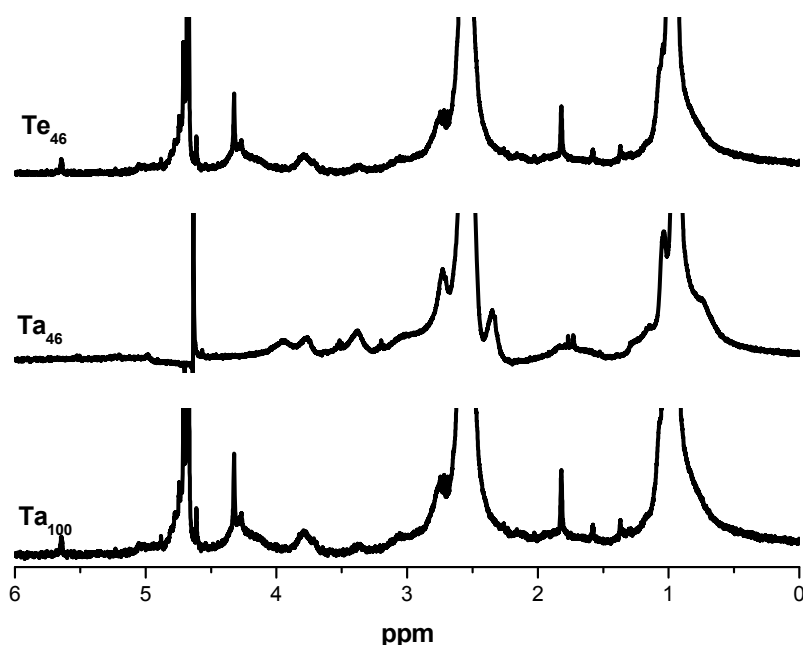
$$A_{4,0-2,2} = 24H_{Ta} + 3H_{HPMA} \quad (2.11)$$

$$A_{2,2-0,1} = 17H_{Ta} + 8H_{HPMA} \quad (2.12)$$

Donde

$$f_{Ta} = \frac{H_{Ta}}{H_{Ta} + H_{HPMA}} \quad (2.13)$$

Obteniéndose los valores de  $f_{Ta}$  (ó  $f_{Te}$ ) de la **tabla 2.2**. La similitud entre  $F$  y  $f$  indica de nuevo que ha habido una adecuada incorporación de las dos unidades a lo largo de las cadenas.



**Figura 2.21.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H del homopolímero  $Ta_{100}$  y del copolímero  $Ta_{46}$  y su análogo  $Te_{46}$ . Las señales marcadas con son las correspondientes al monómero HPMA.

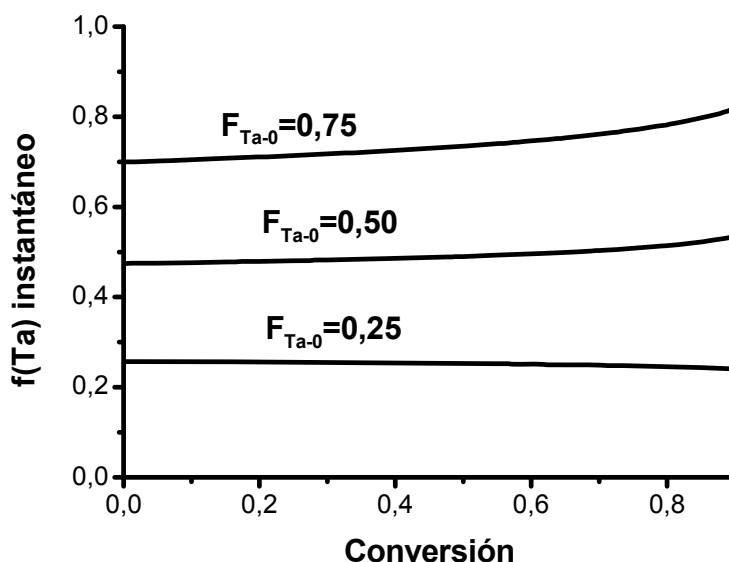
Aunque para ambos sistemas poli(EPA-co-HPMA) y poli(Ta-co-HPMA) se han preparado copolímeros en todo el rango de relaciones molares, la discrepancia en las relaciones nominales elegidas para los dos sistemas tiene su origen en el gran volumen de Ta y en el hecho de que porta tres aminas terciarias en su estructura (con respecto a EPA que solo tiene una). La elección de composiciones que se muestra en las **tablas 2.1** y **2.2** se ha llevado a cabo para tener sistemas con similar carga molar de amina, pues las fracciones molares nominales de Ta (0,25; 0,46 y 0,75) tienen una carga de amina similar a los sistemas más ricos en amina del poli(EPA-co-HPMA) ( $F_{EPA}$ =0,50; 0,70 y 0,90) tal y como se muestra en la **tabla**

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

**2.2.** Estos copolímeros de EPA y HPMA más ricos en EPA han sido además los únicos capaces de complejar ADN.

En la **tabla 2.2**, así como en la **figura 2.21**, se ha incluido el copolímero poli(Te-co-HPMA) 46:54, Te<sub>46</sub>, el cual se ha preparado como sistema modelo degradable con igual carga de amina que el copolímero de Ta de composición intermedia para evaluar en el **Capítulo 3** la influencia de la hidrólisis y liberación de la triamina en la respuesta celular.

Un aspecto muy interesante relacionado con las diferencias entre EPA y Ta (el primero es una monoamina mientras que Ta es una triamina), es el análisis comparativo de la distribución y densidad de aminas cationizables a lo largo de la cadena para ambos sistemas. Este aspecto se ha descrito de forma teórica en este trabajo usando el programa Copol y asumiendo que las copolimerizaciones están gobernadas por el modelo terminal. El modelo terminal, descrito en la introducción de este capítulo, puede ser usado con fines descriptivos a nivel composicional aunque es bien conocido que es solo un modelo aproximado<sup>35</sup>. Para llevar a cabo esta descripción teórica, en el caso del sistema EPA-HPMA se han aproximado las relaciones de reactividad a valores de 1 debido al hecho de que ambos monómeros poseen grupos polimerizables estructuralmente similares (metacrilamidas alifáticas en ambos casos). En el caso del sistema Ta-HPMA, y dado que Ta es un metacrilato alifático, se han usado unos valores de relaciones de reactividad de la literatura para la pareja metacrilato de metilo (MMA)-HPMA de  $r_{\text{MMA}}=0,66$  y  $r_{\text{HPMA}}=0,84$ <sup>38</sup>.



**Figura 2.22.** Fracción molar instantánea en el copolímero de Ta en función de la conversión para las 3 copolimerizaciones estudiadas en esta tesis.  $F_{\text{Ta-0}}$  es la fracción molar inicial de Ta en alimentación.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

Ambas copolimerizaciones rinden sistemas bastante homogéneos composicionalmente, especialmente en el caso del EPA-HPMA ya que la asignación tentativa de relaciones de reactividad a 1 significa que ambos monómeros se incorporan con igual preferencia. En el caso de las relaciones elegidas para Ta-HPMA, las cuales son menores de la unidad, aunque cercanas a la misma, existe una pequeña tendencia a la alternancia ya que cada macrorradical tiene una ligera preferencia por el comonómero heterólogo. En cualquier caso, los valores son similares y las reacciones son composicionalmente muy homogéneas, como se muestra en la **figura 2.22**. En esta figura, obtenida por Copol, se muestra la variación de la composición del copolímero formado en cada instante (en términos de fracción molar de Ta,  $f_{Ta}$ ) en función de la conversión.

En cuanto a la distribución de unidades, y en concreto la distribución de cargas, Copol nos ofrece esta información a nivel de secuencias como por ejemplo triadas. Así para el sistema EPA-HPMA, y suponiendo conversión total en la reacción, se obtienen las fracciones molares acumuladas de secuencias centradas en EPA (*E* en la secuencia) y HPMA (*H*) que se muestran en la **tabla 2.3**. Obviamente, para cada familia, la suma de las fracciones molares de las tres triadas corresponde a la fracción molar nominal de EPA o HPMA en alimentación. La densidad de carga de los sistemas EPA<sub>30</sub> y especialmente EPA<sub>10</sub> es muy baja, y de hecho tal y como se describe en el **Capítulo 3** no son capaces de complejar ADN. En los otros tres sistemas que contienen EPA la densidad de carga aumenta correlativamente con la cantidad de EPA y ya es suficiente para complejar ADN, aunque la microestructura es diferente. EPA<sub>50</sub> presenta una mayoría de cargas rodeadas por *E* y *H* (la mayor fracción molar es la de *EEH*), mientras que EPA<sub>70</sub> y sobre todo EPA<sub>90</sub> presentan una mayoría de triadas *EEE*, es decir, una alta densidad local de aminas.

**Tabla 2.3.** Fracciones molares acumuladas de triadas centradas en EPA y HPMA simuladas por Copol para las diferentes reacciones suponiendo que alcanzan conversión total. El asterisco en *EEH* así como en *HHE* significa que se incluyen las secuencias *HEE* y *EHH* respectivamente.

	$f_{EEE}$	$f_{EEH^*}$	$f_{HEH}$	$f_{HHH}$	$f_{HHE^*}$	$f_{EHE}$
<b>EPA<sub>90</sub></b>	0,73	0,16	0,0089	0,0011	0,018	0,081
<b>EPA<sub>70</sub></b>	0,35	0,29	0,062	0,028	0,13	0,14
<b>EPA<sub>50</sub></b>	0,13	0,25	0,12	0,13	0,25	0,12
<b>EPA<sub>30</sub></b>	0,028	0,13	0,14	0,35	0,29	0,062
<b>EPA<sub>10</sub></b>	0,0011	0,018	0,081	0,73	0,16	0,0089

El sistema Ta-HPMA es diferente del anterior en el sentido de que Ta presenta siempre de forma intrínseca tres aminas contiguas en su estructura monomérica. Esta diferencia hace que por ejemplo Ta<sub>25</sub> sí sea capaz de complejar ADN. En la **tabla 2.3** se ha representado la predicción microestructural de triadas centradas en Ta (Ta es *T* en la secuencia) y HPMA tal y como lo ofrece Copol,

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

**Tabla 2.4.** Columnas de la izquierda: Fracciones molares acumuladas de triadas centradas en Ta y HPMA simuladas por Copol para las diferentes reacciones suponiendo que alcanzan conversión total. El asterisco en TTH así como en HHT significa que se incluyen las secuencias HTT y THH respectivamente.

	$f_{TTT}$	$f_{TTH^*}$	$f_{HTH}$	$f_{HHH}$	$f_{HHT^*}$	$f_{THT}$
<b>Ta<sub>75</sub></b>	0,40	0,29	0,058	0.0086	0.074	0.17
<b>Ta<sub>46</sub></b>	0,083	0,22	0,16	0.12	0.27	0.15
<b>Ta<sub>25</sub></b>	0,0076	0,072	0,17	0.39	0.30	0.057

Teniendo en cuenta que T es una triamina, y por tanto se concentra de forma intrínseca en la estructura monomérica una alta densidad de aminas, la densidad local será siempre alta.

En la **tabla 2.1** se muestran los pesos moleculares de los polímeros poli(EPA-co-HPMA), así como del correspondiente homopolímero EPA<sub>100</sub>, obtenidos mediante GPC, utilizando DMF como disolvente. En la **tabla 2.2** se muestran los pesos moleculares de los polímeros dendrónicos. Debido a que estos últimos sistemas no ofrecían contraste suficiente en índice de refracción usando DMF y que tampoco se pudieron medir usando una disolución tampón a pH ácido como eluyente, se llevó a cabo una hidrólisis completa del éster metacrílico (en condiciones drásticas, exceso de NaOH y 80 °C, durante 24 horas), y se analizó el residuo poli(ácido metacrílico-co-HPMA). En la **tabla 2.1** se puede observar como los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) presentan unos pesos moleculares significativamente inferiores a los del homopolímero poli-EPA, además de un menor valor de polidispersidad. Es destacable también cómo el peso molecular de los copolímeros aumenta al incrementar la proporción del monómero HPMA, presentando el sistema EPA<sub>10</sub> un peso molecular muy superior al mostrado por el polímero EPA<sub>90</sub>. Respecto a los polímeros dendrónicos (**tabla 2.2**), el homopolímero Ta<sub>100</sub> así como sus correspondientes copolímeros con HPMA, presentan también pesos moleculares bajos. La razón de estos bajos pesos moleculares no ha sido explorada en este trabajo, aunque estos valores son compatibles con la existencia de fenómenos de transferencia durante la reacción de polimerización. En cualquier caso, y tal y como se describirá en el siguiente capítulo, los polímeros con densidad de carga suficiente han sido capaces de complejar ADN con independencia de su peso molecular y han dado lugar a *polyplexes* de tamaños adecuados (50-400 nm) en la mayoría de los casos.

Se han determinado los valores de pK<sub>a</sub> de los diferentes copolímeros mediante una valoración con NaOH, previa ionización de todos los grupos amino. Los monómeros catiónicos EPA, Ta y Te, y por tanto, los polímeros en los que estén presentes, poseen grupos amino terciarios en la cadena lateral que proporcionan carácter ionizable, protonándose en condiciones ácidas. En este trabajo se determinó el valor de pK<sub>a</sub> mediante una valoración con NaOH, previa ionización de todos los grupos amino. Los resultados obtenidos han mostrado unos valores similares de pK<sub>a</sub> en todos los copolímeros analizados, tanto en los sistemas EPA-HPMA como Ta-HPMA, en el rango 8,1-8,8. Debe tenerse en cuenta que, dada la naturaleza

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

polimérica de las poliaminas y la naturaleza dendrítica de Ta o Te, no existe un único valor discreto de  $pK_a$  para cada polímero sino un intervalo ya que el  $pK_a$  de cada amina depende del ambiente particular en que se encuentre dentro de la cadena macromolecular, pudiendo existir pequeñas variaciones asociadas a efectos estéricos y las posibles repulsiones entre las cadenas laterales ionizadas<sup>39</sup>.

### 2.3.2.1 Estudio del carácter hidrolizable de poli(Te-co-HPMA)

Como se ha mencionado antes, se ha preparado el derivado hidrolizable poli(Te-co-HPMA) con una  $F_{Te}=0.46$  para ser estudiado comparativamente. La hidrólisis del éster en el copolímero se ha representado en la **figura 2.23**. Se libera un derivado de TEDETA con un resto ácido carboxílico libre, y queda anclado al polímero un resto OH (en realidad una unidad de metacrilato de hidroxietilo. HEMA). A porcentajes de hidrólisis por debajo del 100% el polímero es un terpolímero de Te, HEMA y HPMA. A conversión total el residuo es un copolímero de HEMA y HPMA.

La hidrólisis se ha podido monitorizar por RMN- $^1H$  *'in situ'*, a 37 °C y en medios tamponados a diferentes valores de pH, gracias a la señal correspondiente al  $CH_2$  unido al  $COOH$  libre. En la **figura 2.23b** se muestran espectros de la zona alifática correspondientes a diferentes tiempos de experimento para la degradación a pH 8. Se observa a 2,4 ppm la aparición de un triplete aislado (\*), asignado al mencionado  $CH_2-COOH$ , cuya intensidad aumenta correlativamente con el tiempo de hidrólisis. Ya que el resto de las señales que aparecen a campo más alto corresponden al conjunto de picos de cadena ( $\beta-CH_2$  y  $\alpha-CH_3$ ) y metilos de HPMA y TEDETA (unido o libre), es decir, 17 protones de Ta o resto TEDETA (que podemos denominar conjuntamente  $Ta^*$ ) y 8 protones de HPMA, se ha podido calcular el porcentaje de hidrólisis mediante el análisis comparativo del área del triplete frente al resto a más alto campo, usando estas ecuaciones:

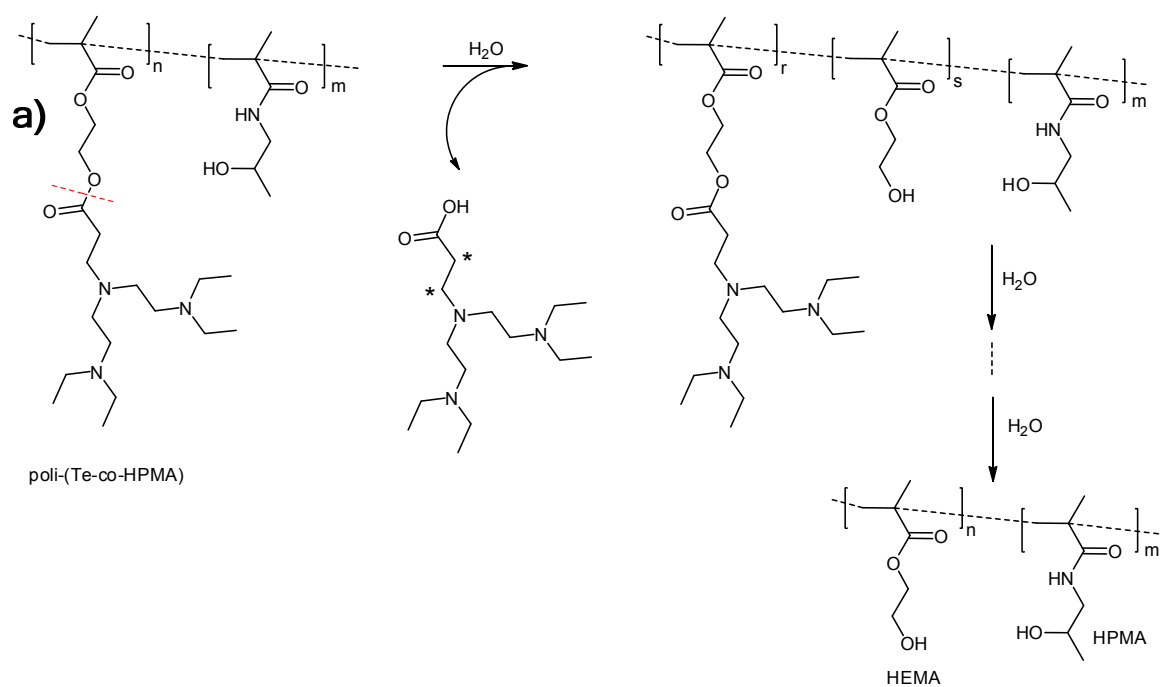
$$A_{2,3-5,5} = 0.42 * 17H_{Ta^*} + 0.58 * 8H_{HPMA} \quad (2.14)$$

$$A_{2,4} = 0.42 * 2H_h \quad (2.15)$$

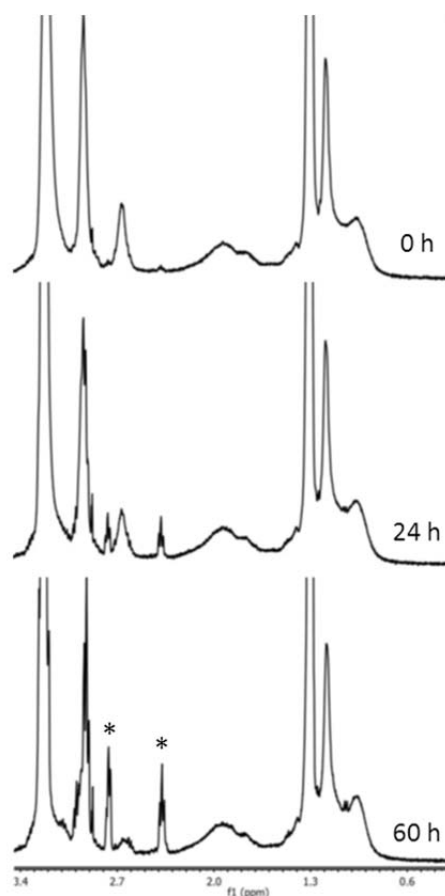
Donde 0,42 y 0,58 son las fracciones molares en el copolímero determinadas experimentalmente (ver **tabla 2.2**) y  $H_h$  es un protón del resto de TEDETA liberado. Por tanto

$$fracción_{hidrolizada} = \frac{H_h}{H_{Ta^*}} \quad (2.16)$$

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros



**b)**

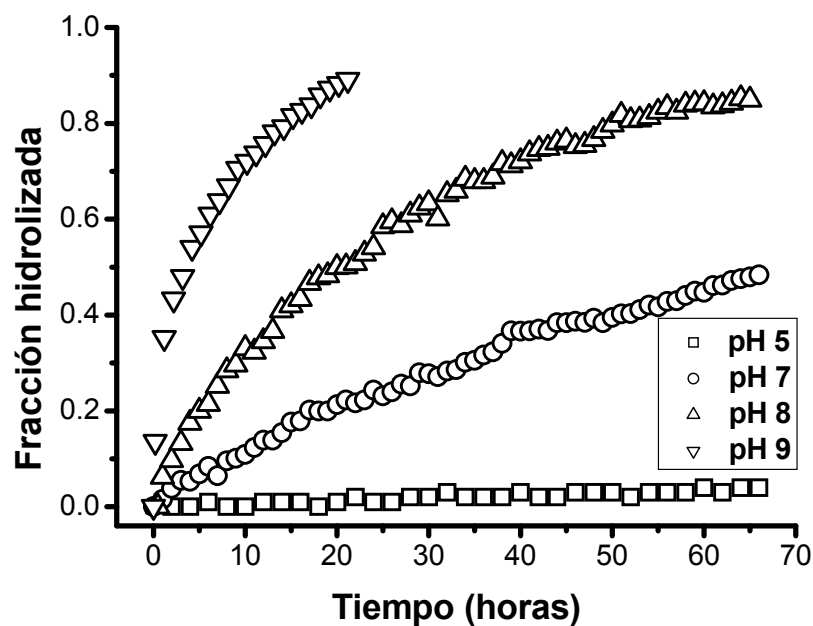


**Figura 2.23.** a) Esquema del proceso de hidrólisis del copolímero  $\text{Te}_{46}$ . b) Espectros representativos de la monitorización *in situ* de la degradación a pH 8, usado como ejemplo.



## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

En la **figura 2.24** se muestran los datos experimentales para los pHs 5, 7, 8 y 9. Hay una influencia clara del pH en la velocidad de hidrólisis, siendo los tiempos de vida media aproximados del éster del orden de pocas horas a pH 9, de 24 horas a pH 8, de varios días a pH 7 y de varias semanas o meses a pH 5. Esta dependencia está relacionada con el aumento de la concentración de OH a pH básico así como con la protonación/desprotonación de la amina pues la activación del éster en beta se debe de producir cuando la amina no está protonada.

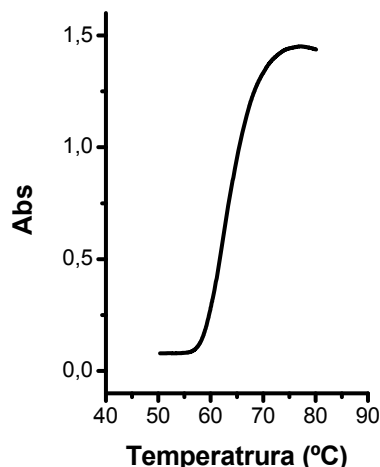


**Figura 2.24.** Fracción hidrolizada del resto TEDETA frente al tiempo para los valores de pH indicados en la leyenda.

### 2.3.2.2 Termosensibilidad de los derivados de Ta y Te

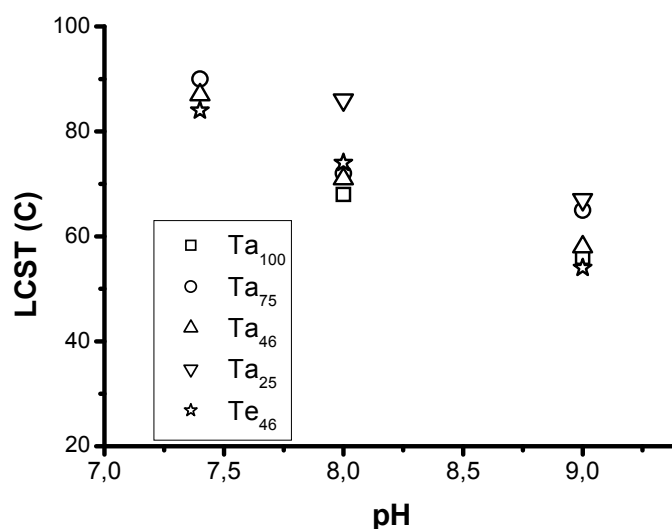
Los derivados de Ta, incluido el homopolímero, han mostrado una doble sensibilidad pues además de los cambios que se producen al cambiar el pH y asociados a la protonación/desprotonación de las aminas, ha mostrado una sensibilidad a la temperatura para pH 7 o superior, es decir, cuando la amina empieza a estar en forma neutra. En concreto han mostrado termosensibilidad negativa tipo LCST, como se muestra mediante turbidimetría en la **figura 2.25** para el copolímero Ta<sub>46</sub> a pH 9 representado como ejemplo. Este polímero, a este pH, es soluble a temperatura ambiente y pierde dicha solubilidad por encima de 60 °C.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros



**Figura 2.25.** Turbidimetría de Ta<sub>46</sub> a pH 9 mostrada como ejemplo.

En la **tabla 2.2** se muestran todas las temperaturas de transición de los sistemas a pH 8 y 9, y estos junto con los observados a pH 7,4 han sido representados en la **figura 2.26**. Hay una dependencia clara con el pH, como ocurre para sistemas aminados análogos como poliEPyM, poliDEAEM o poliDMAEM. No hay sin embargo una dependencia clara de la composición o de la cantidad de HPMA presente en el sistema. Sin embargo, es bien conocido que la copolimerización de unidades termosensibles con otras unidades hidrofílicas e hidrofóbicas desplazan la LCST a mayores o menores temperaturas respectivamente. En este caso no existe apenas variación del valor de transición al cambiar la composición, lo cual es probablemente debido a que HPMA tiene una naturaleza anfifílica y no desplaza el balance hidrofílico/hidrofóbico global. Además, la naturaleza dendrítica de Ta (ó Te) hace que parte de sus aminas sean menos sensibles al entorno<sup>12-14</sup>.



**Figura 2.26.** Temperaturas de transición (LCSTs) de los polímeros dendrónicos, medidas por turbidimetría, frente al pH.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

En todo caso, los copolímeros han mostrado termosensibilidad por encima de temperatura ambiente por lo que no se espera que este fenómeno influya en los experimentos de respuesta celular, ya que a 37 °C los polímeros son todos solubles a cualquier pH.

### 2.3.3 Síntesis y caracterización de copolímeros de EPA con las unidades glucosídicas

En las **tablas 2.5 a 2.7** se muestran las características composicionales de los copolímeros de EPA con unidades glucosídicas, poli(EPA-co-CDSt), poli(EPA-co-MCDSt), poli(EPA-co-GLCSt), poli(EPA-co-MGLCSt), cuyas estructuras se han representado de nuevo en la **figura 2.27**. En este trabajo se han utilizado los acrónimos CDSt<sub>z</sub>, MCDSt<sub>z</sub>, GLCSt<sub>z</sub> y MGLCSt<sub>z</sub> para denominar a los copolímeros poli(EPA-co-CDSt), poli(EPA-co-MCDSt), poli(EPA-co-GLCSt) y poli(EPA-co-MGLCSt), respectivamente, siendo Z el tanto por ciento nominal de la unidad glucosídica correspondiente.

**Tabla 2.5.** Fracciones molares de CDSt<sub>z</sub> y MCDSt<sub>z</sub> (siendo Z el tanto por ciento nominal de (M)CDSt) en alimentación y en los copolímeros, pesos moleculares (Da) y polidispersidades para los sistemas EPA-CDSt y EPA-MCDSt.

	F <sub>CDSt</sub>	f <sub>CDSt</sub>	M <sub>w</sub>	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
CDSt <sub>5</sub>	0,05	0,06	-	-	-
CDSt <sub>10</sub>	0,10	0,11	-	-	-
	F <sub>MCDSt</sub>	f <sub>MCDSt</sub>	M <sub>w</sub>	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
MCDSt <sub>5</sub>	0,05	0,05	29.000	13.000	2,1
MCDSt <sub>10</sub>	0,10	0,12	13.000	10.000	1,3
MCDSt <sub>20</sub>	0,20	0,18	17.000	12.000	1,4
MCDSt <sub>100</sub>	1	1	20.000	13.000	1,5

**Tabla 2.6.** Fracciones molares de GLCSt<sub>z</sub> (siendo Z el tanto por ciento nominal de GLCSt) en alimentación y en los copolímeros, pesos moleculares (Da) y polidispersidades del sistema EPA-GLCSt.

	F <sub>GLCSt</sub>	f <sub>GLCSt</sub>	M <sub>w</sub>	M <sub>n</sub>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>
GLCSt <sub>5</sub>	0,05	0,06	27.000	13.000	2,1
GLCSt <sub>10</sub>	0,10	0,09	18.000	14.000	1,3
GLCSt <sub>20</sub>	0,20	0,23	12.000	11.000	1,1
GLCSt <sub>35</sub>	0,35	0,36	-	-	-
GLCSt <sub>70</sub>	0,70	0,67	-	-	-

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

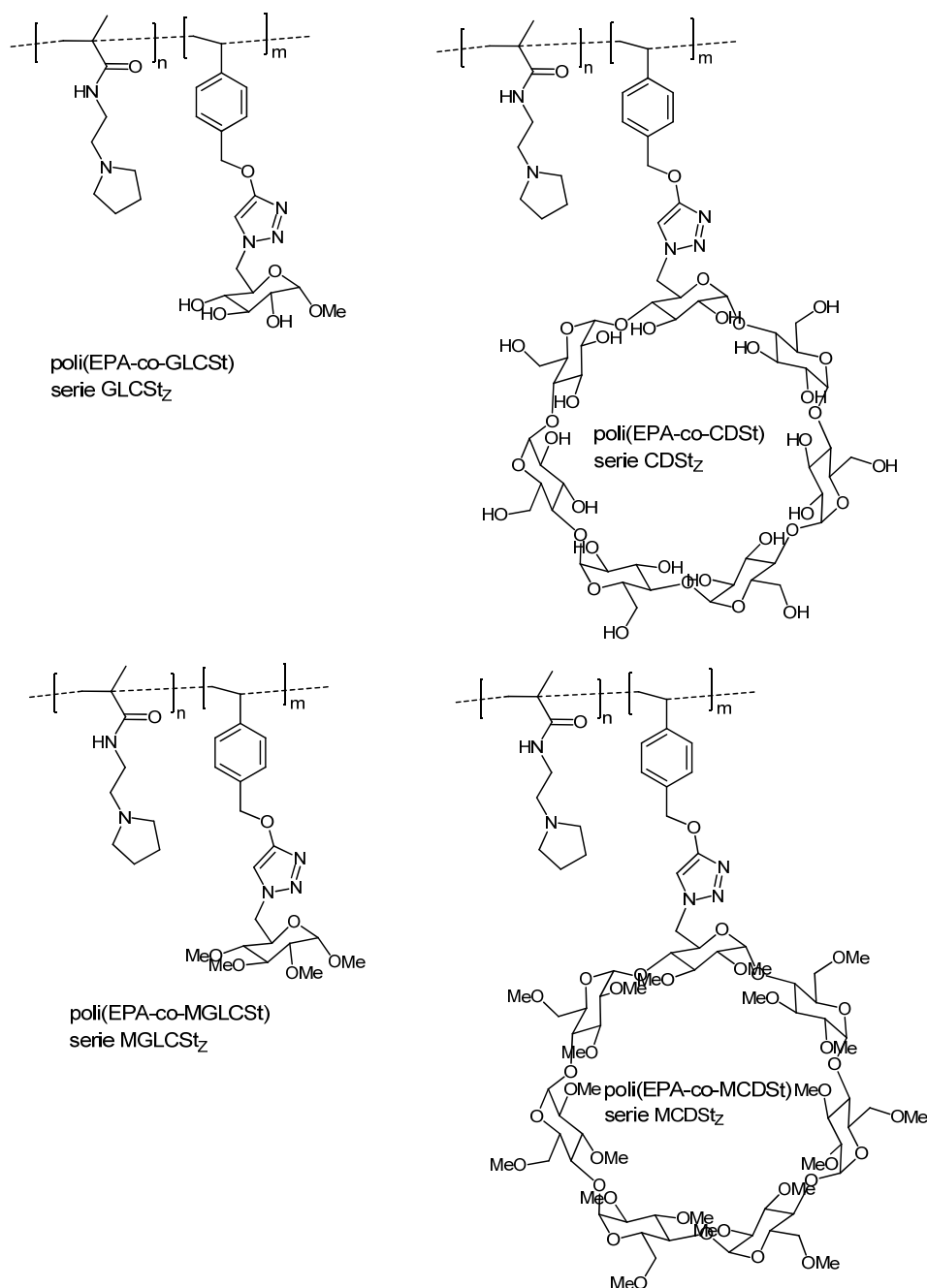
**Tabla 2.7.** Fracciones molares de MGLCSt (siendo Z el tanto por ciento nominal de MGLCSt) en alimentación y en los copolímeros, pesos moleculares (Da) y polidispersidades del sistema EPA-MGLCSt.

	$F_{\text{MGLCSt}}$	$f_{\text{MGLCSt}}$	$M_w$	$M_n$	$M_w/M_n$
<b>MGLCSt<sub>5</sub></b>	0,05	0,07	38.000	12.000	3
<b>MGLCSt<sub>10</sub></b>	0,10	0,13	40.000	17.000	2,3
<b>MGLCSt<sub>20</sub></b>	0,20	0,22	14.000	12.000	1,2
<b>MGLCSt<sub>35</sub></b>	0,35	0,34	29.000	19.000	1,5
<b>MGLCSt<sub>70</sub></b>	0,70	0,72	42.000	26.000	1,6

Los monómeros CDSt y MCDSt son entidades muy voluminosas y pueden considerarse macromonómeros. Los monómeros GLCSt y MGLCSt en cambio se pueden considerar como modelos estructuralmente simples de los anteriores. La polimerización de todos ellos tiene características distintivas, y hay diferentes aspectos que pueden tener una influencia en la polimerización, como por ejemplo la solubilidad de los monómeros no permitilados es mucho más restringida que la de los permitilados, especialmente en el caso del derivado de CD, ya que la  $\beta$ -CD es uno de los tipos de CD menos soluble debido a su configuración espacial, que favorece la formación enlaces de hidrógeno dentro del anillo oligosacárido<sup>40</sup>. Debido a ello, el monómero CDSt sólo ha podido ser copolimerizado en una mezcla de DMF y DMSO. Esta problemática asociada a la formación de enlaces de hidrógeno puede ser así mismo la responsable de la baja solubilidad de los copolímeros de CD no permitilada y de aquellos ricos en glucosa (no permitilada).

Por otra parte, aunque a veces la polimerización de macromonómeros tan voluminosos está comprometida por cuestiones de impedimento estérico, todos los derivados han podido ser copolimerizados con EPA. Incluso se ha podido preparar el homopolímero de MCDSt, el cual va a ser usado como modelo en el estudio celular. En las **figuras 2.28 a 2.31** se muestran espectros de RMN de protón de algunos de los copolímeros obtenidos a alta conversión, elegidos a modo de ejemplo. Se observa que se incorporan ambas unidades, y cómo al ir cambiando la composición, observamos distintas intensidades en las señales asignadas a cada uno de los monómeros implicados, aumentando o disminuyendo éstas en función del aumento o disminución de la fracción molar del correspondiente monómero en la alimentación del copolímero.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros



**Figura 2.27.** Estructura química de los diferentes copolímeros derivados de  $\beta$ -CD y  $\alpha$ -glucosa sintetizados y caracterizados en la presente tesis doctoral.

Así, para todos los sistemas, se observa cómo al aumentar el contenido en unidad glucosídica, se incrementan las señales aromáticas de los anillos estirénicos y de triazol en la región 8-6,5 ppm, así como las señales del anillo glucosídico y en su caso los metilos cuando los compuestos son permetilados en torno a 3,5 ppm en detrimento de las señales características de EPA a 2,5 y 1,6 ppm. A partir del análisis de las integrales de estos espectros se han podido determinar las composiciones de ambas unidades, utilizando para todos los sistemas las señales aromáticas en para del anillo estirénico centradas en 7 (4 protones de unidad glucosídica) y el pico del  $\alpha$ -CH<sub>3</sub> entre 1,2 y 0,4 ppm (3 protones de EPA). La composición se puede calcular en este caso a partir de estas ecuaciones:

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

$$A_{7.3-6.5} = 4H_{\text{unidad glucosídica}} \quad (2.17)$$

$$A_{1.2-0.4} = 3H_{EPA} \quad (2.18)$$

Donde

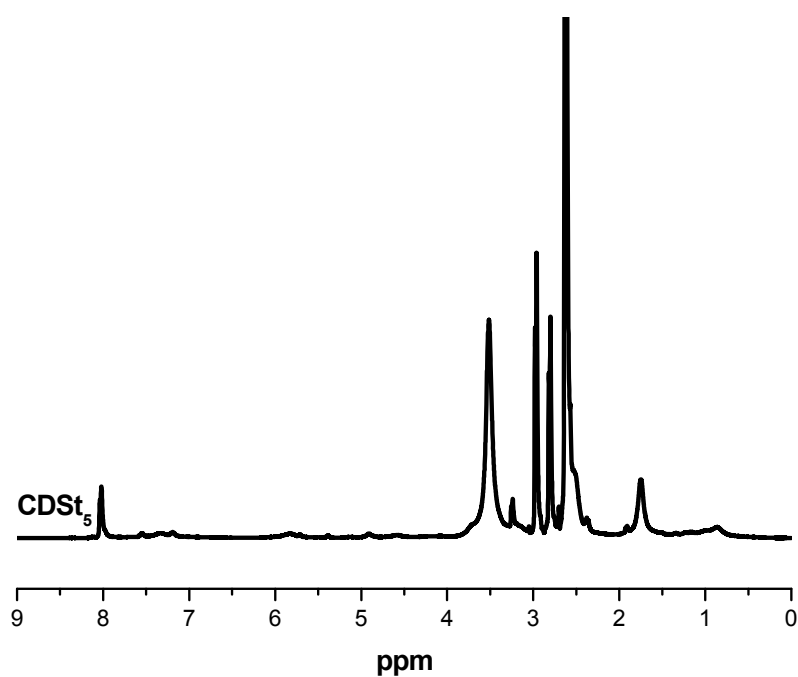
$$f_{U-St} = \frac{H_{U-St}}{H_{U-St} + H_{EPA}} \quad (2.19)$$

Obteniéndose los valores de fracciones molares en los copolímeros de las **tablas 2.5 a 2.7**. La similitud entre los valores de F y f indica una adecuada incorporación de ambas unidades, aunque hay que señalar que los sistemas que contienen GLCSt y CDSt, es decir, las formas hidroxiladas de los azúcares, que presentan problemas de solubilidad, han dado lugar en agua deuterada a espectros de señales muy anchas típicas de protones que relajan muy mal, lo cual puede estar relacionado con su baja solubilidad. Esta pobre relajación parece indicar la existencia de grupos en la estructura polimérica que son difícilmente accesible al medio acuoso. El error en el cálculo de la composición en este tipo de espectros es mayor aunque la tendencia cualitativa está de acuerdo a lo esperado.

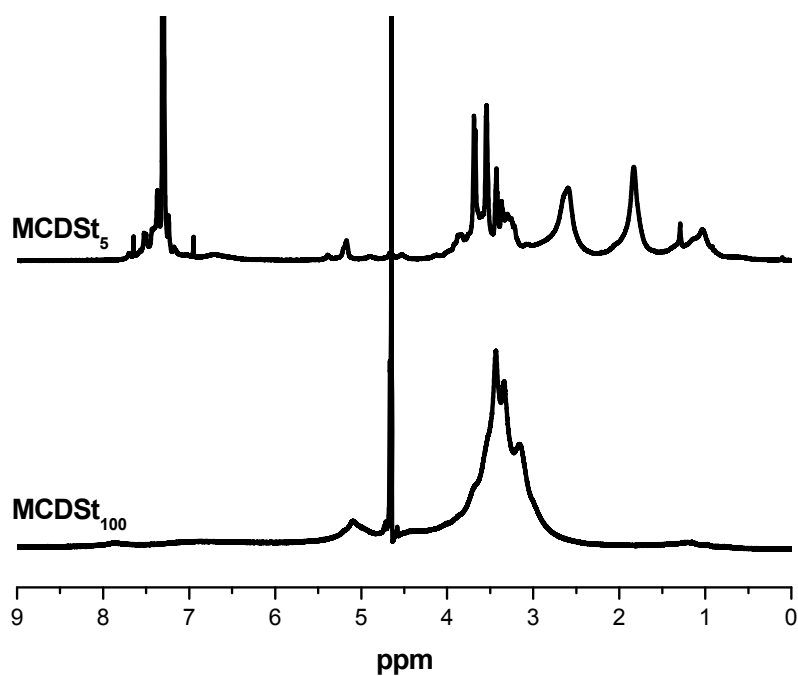
La problemática asociada a la solubilidad mencionada antes, que se puede asociar a la formación de enlaces de hidrógeno, ha impedido que los derivados de CDSt o los copolímeros ricos en GLCSt hayan podido ser analizados por GPC. Los pesos moleculares promedio en número de los que sí han podido ser medidos están en el rango 10 a 30 kDa, siendo la mayoría cercanos a 10 kDa, es decir, son cadenas cortas. Este hecho, sumado a las bajas polidispersidades observadas, es compatible con la existencia de fenómenos de transferencia. Como se ha mencionado antes, no se ha estudiado la razón de estos bajos moleculares pues estos copolímeros han formado *polyplexes* con ADN de tamaños apropiados.

Tal y como se ha hecho para los copolímeros con HPMA, en estas familias se ha llevado a cabo una descripción básica de la distribución de unidades, de nuevo usando el software Copol. Como antes, se ha asumido que las copolimerizaciones están gobernadas por el modelo terminal, y se han usado las relaciones de reactividad de la pareja estireno/HPMA tomadas de la literatura,  $r_{HPMA}=0,53$ ,  $r_{St}=1,72^{38}$ . Estos valores indican que los macrorradicales en crecimiento son ligeramente más reactivos hacia la unidad estirénica que hacia HPMA, lo que hace que exista cierta heterogeneidad en la copolimerización en un recipiente cerrado como se muestra en la **figura 2.32** en la que se ha representado la fracción molar instantánea de la unidad glucosídica estirénica (U-St de forma genérica) en función de la conversión para las diferentes reacciones estudiadas aquí. Existe cierta heterogeneidad, formándose primero cadenas más ricas en los estirénicos.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

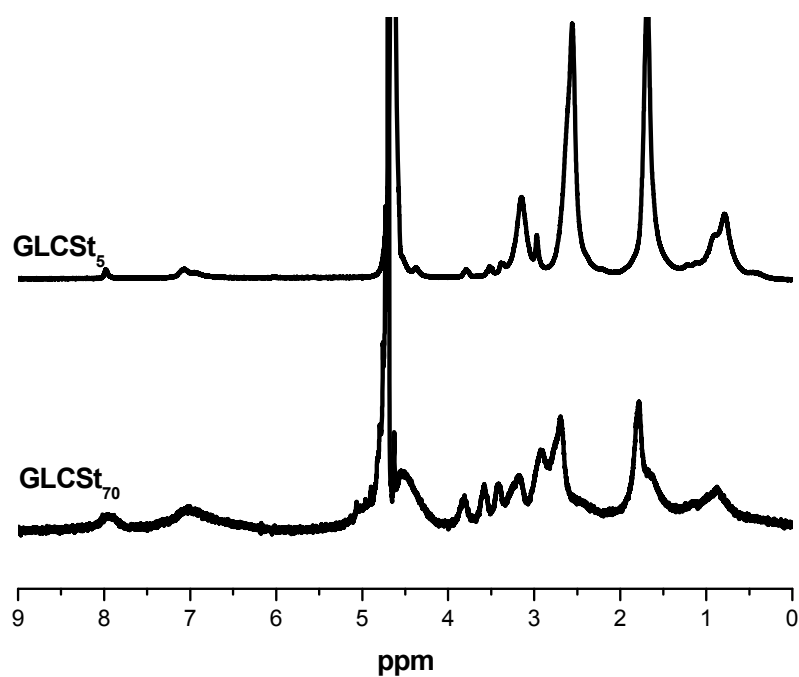


**Figura 2.28.** Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  del copolímero  $\text{CDSt}_5$ . Las señales intensas a 2,7, 2,9 y 8 ppm corresponden a  $\text{DMF}$  residual.

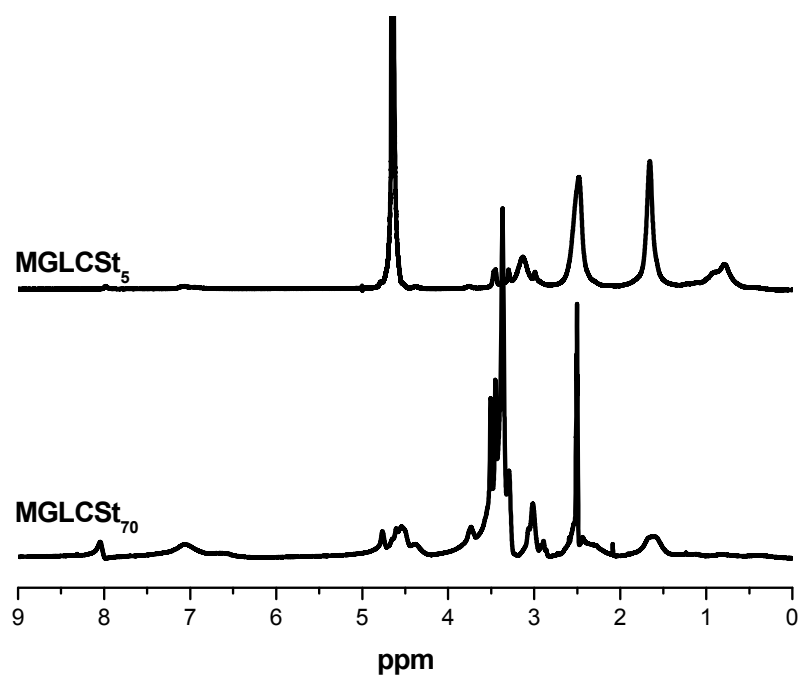


**Figura 2.29.** Espectros de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  del homopolímero  $\text{MCDSt}_{100}$  y del copolímero  $\text{MCDSt}_5$ .

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

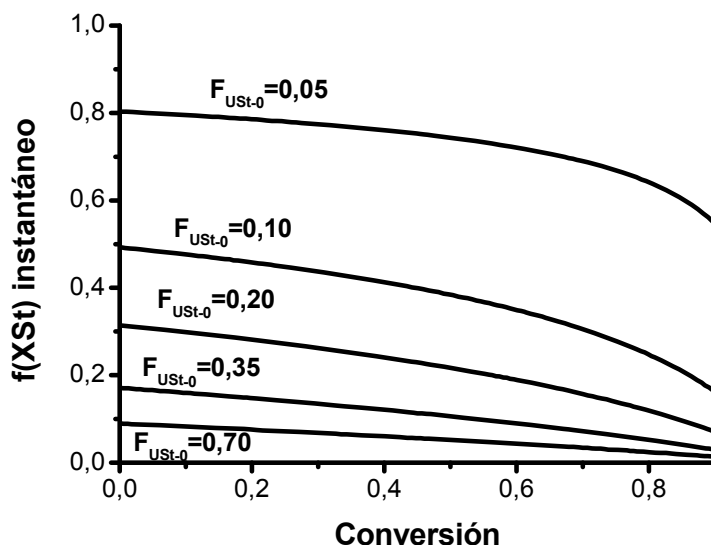


**Figura 2.30.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de dos de los diferentes copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) sintetizados y caracterizados en esta tesis doctoral.



**Figura 2.31.** Espectros de RMN- $^1\text{H}$  de dos de los diferentes copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt) sintetizados y caracterizados en esta tesis doctoral.





**Figura 2.32.** Fracción molar instantánea en el copolímero de la unidad estirénica en función de la conversión para las copolimerizaciones estudiadas en este trabajo.  $F_{USt-0}$  es la fracción molar inicial de U-St en la alimentación.

Como antes, Copol nos describe la distribución de secuencias en términos de triadas. En la **tabla 2.8** se recogen las triadas centradas en cualquiera de las unidades glicosídicas USt ( $U$  en la secuencia) y EPA

**Tabla 2.8.** Fracciones molares acumuladas de triadas centradas en EPA y U-St simuladas por Copol para las diferentes reacciones suponiendo que alcanzan conversión total. El asterisco en UUE así como en EEU significa que se incluyen las secuencias EUU y UEE respectivamente.

	$f_{UUU}$	$f_{UUE}^*$	$f_{EUE}$	$f_{EEE}$	$f_{EEU}^*$	$f_{UEU}$
<b>USt<sub>05</sub></b>	0.00020	0.0054	0.0044	0.86	0.088	0.0029
<b>USt<sub>10</sub></b>	0.0014	0.020	0.079	0.73	0.16	0.011
<b>USt<sub>20</sub></b>	0.011	0.068	0.12	0.52	0.24	0.036
<b>USt<sub>35</sub></b>	0.053	0.16	0.14	0.30	0.27	0.08
<b>USt<sub>70</sub></b>	0.36	0.27	0.063	0.042	0.12	0.14

Además de esta distribución de unidades, hay que considerar la diferente naturaleza de los restos CD y GLC, ya que las CD son entidades mucho más voluminosas que los derivados de glucosa. Este aspecto, junto con el de la densidad de carga, será tenido en cuenta en el **Capítulo 3** a la hora de evaluar la influencia de la estructura y microestructura en la complejación de estos copolímeros con ADN.

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

### 2.4. Bibliografía

1. D. Velasco, C. Elvira, J. San Román. New stimuli-responsive polymers derived from morpholine and pyrrolidine. *J Mater Sci: Mater Med* **2008**, 19, 1453–1458
2. E. G. Doyagüez, J. Rodríguez-Hernández, G. Corrales, A. Fernández-Mayoralas, A. Gallardo, Water-Soluble Pendant Copolymers Bearing Proline and Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin: pH-Dependent Catalytic Nanoreactors, *Macromolecules*. **2012**, 45, 19, 7676–7683
3. D. M. Langer. Degradable Poly(b-amino esters) Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *JACS* **2000**, 122, 10761-10768.
4. Y. B. Lim, Y. H. Choi., and J. S. Park, A Self-Destroying Polycationic Polymer Biodegradable *JACS* **1999**, 121, 5633-5639
5. A. Metters, J. Hubbell. Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1, 290-301
6. D. Schmaljohann. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1655–1670
7. R. París, I. Quijada-Garrido. Temperature- and pH-responsive behaviour of poly(2-(2-methoxyethoxy) ethyl methacrylate-co-N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) hydrogels. *European Polymer Journal* **2010**, 46, 2156–2163
8. R. Liu, M. Fraylich, B. Saunders. Thermoresponsive copolymers: from fundamental studies to applications. *Colloid & Polymer Science* **2009**, 287, 6, 627-643.
9. L. Taylor, L. Cerankowski. Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions-a study of lower consolute behavior. *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* **1975**, 13, 11, 2551-2570.
10. M. Heskins, J. Guillet. Solution properties of poly (N-isopropylacrylamide). *Journal of Macromolecular Science, Part A* **1968**, 2, 8, 1441-1455.
11. L. Klouda, A. G. Mikos. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics* **2008**, 68, 1, 34-45.
12. S. Liu, J. V. M. Weaver, Y. Tang, N. C. Billingham, S. P. Armes. Synthesis of Shell Cross-Linked Micelles with pH-Responsive Core sUsing ABC Triblock Co*Macromolecules* **2002**, 35, 6121-6131
13. A. Schmailz, M. Hanisch, H. Schmalz, A.H.E. Müller. Double stimuli-responsive behavior of linear and star-shaped poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate). *Polymer* **2010**, 51, 6, 1213-1217
14. N. González, C. Elvira, J. San Román. Novel dual-stimuli responsive polymers derived from ethyrrrolidine. *Macromolecules*. **2005**, 38, 9298-9303
15. G. Odian. Principles of polymerization. 3ª Edición. Wiley Interscience **1991**
16. B. Boutevin. From telomerization to living radical polymerization. *J Polym Sci A: Polym Chem*. **2000**, 38, 3235
17. S. Penczek. Terminology of kinetics, thermodynamics, and mechanisms of polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2002**, 40, 11, 1665-1676.
18. G. Odian. Chain Copolymerization. John Wiley & Sons, Inc **2004**, 464-543.
19. T. Fukuda; Y. D. Ma; H. Inagaki. Free-radical copolymerization. 3. Determination of rate constants of propagation and termination for styrene/methyl methacrylate system. A critical test of terminal-model kinetics. *Macromolecules* **1985**, 18, 1, 17-26.
20. K. Matyjaszewski; T. P. Davis; J. Wiley. Handbook of radical polymerization. **2002**.
21. F. R. Mayo, F. M. Lewis. Copolymerization. I. A Basis for Comparing the Behavior of Monomers in Copolymerization; The Copolymerization of Styrene and Methyl Methacrylate *J. Am. Chem. Soc.* **1944**, 66, 1594-1601

## 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

22. T. Alfrey, G. Goldfinger. The mechanism of copolymerization. *The Journal of Chemical Physics* **1944**, 12, 205.
23. Copol®, R. N., May 2004, Part of the program can be found at: A. Gallardo, M. R. Aguilar, G. Abraham, J. San Román, *Journal of Chemical Education* **2004**, 81, 1210-1215.
24. K. Ulbrich, J. Strohalm, D. Plocova, M. Jelinkova, B. Rihova. Polymeric drugs based on conjugates of synthetic and natural macromolecules. I. Synthesis and physico-chemical characterisation. *Journal of Controlled Release* **2000**, 64, 63-69.
25. D. Demirgoz, R. Navarro, M. Pérez, H. Reinecke, A. Gallardo. Asymmetric bi-homologous crosslinkers for bicomponent gels – the way to strongly increased elastic moduli, *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, 115, 896-900
26. X. Ma, J. Tang, Y. Shen, M. Fan, H. Tang, M. Radosz. Facile synthesis of polyester dendrimers from sequential click coupling of asymmetrical monomers. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 41, 14795-14803
27. B. Reddy, R. Arshady, M. George. Copolymerization of *N*-vinyl-2-pyrrolidone with 2, 4, 5-trichlorophenyl acrylate and with 2-hydroxyethyl methacrylate: Reactivity ratios and molecular weights. *European Polymer Journal* **1985**, 21, 6, 511-515.
28. E. Juaristi, V. Soloshonok, Enantioselective synthesis of beta-amino acids. Wiley-VCH **2005**.
29. M. Liu, M. P. Sibi. Recent advances in the stereoselective synthesis of  $\beta$ -amino acids. *Tetrahedron* **2002**, 58 40, 7991-8035
30. P. Teyssie, J. Baran, P. Dubois, R. Jerome, J. S. Wang, J. Yu. Living anionic polymerization of (meth)acrylic esters. New mechanistic concepts and resulting materials. *Macromol Symp* **1998**, 132, 303–307.
31. B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long. Michael addition reactions in macromolecular design for emerging technologies *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, 487–531
32. D. Wu, Y. Liu, L. Chen, C. He, T. S. Chung, S. H. Goh.  $2A_2 + BB'B''$  Approach to Hyperbranched Poly(amino ester)s. *Macromolecules* **2005**, 38, 5519-5525
33. D. M. Langer. Degradable Poly(b-amino esters) Synthesis, Characterization, and Self-Assembly with Plasmid DNA. *JACS* **2000**, 122, 10761-10768.
34. Y. B. Lim, Y. H. Choi., and J. S. Park, A Self-Destroying Polycationic Polymer Biodegradable *JACS* **1999**, 121, 5633-5639
35. A. Metters, J. Hubbell. Network formation and degradation behavior of hydrogels formed by Michael-type addition reactions. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1, 290-301
36. Y. Lim, Y. H. Choi, J. Park. A Self-Destroying Polycationic Polymer: Biodegradable Poly(4-hydroxy-L-proline ester) *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 24, 5633-5639
37. M. Coote, T. P. Davis. The mechanism of the propagation step in free-radical copolymerization. *Prog. Polym. Sci.* **1999**, 24, 1217-1251
38. J. Kopecek, H. Bazilova, Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide)-I-radical polymerization and copolymerization. *Eur. Poly. J.* **1973**, 9, 7-14
39. D. Matulis, V. A. Bloomfield. Thermodynamics of the hydrophobic effect. I. Coupling of aggregation and  $pK_a$  shifts in solutions of aliphatic amines. *Biophys. Chem.* **2001**, 93, 37-51
40. M. E. Davis, M. E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* **2004**, 3, 12, 1023-35.



### **3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección**



## 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

### 3.1. Introducción

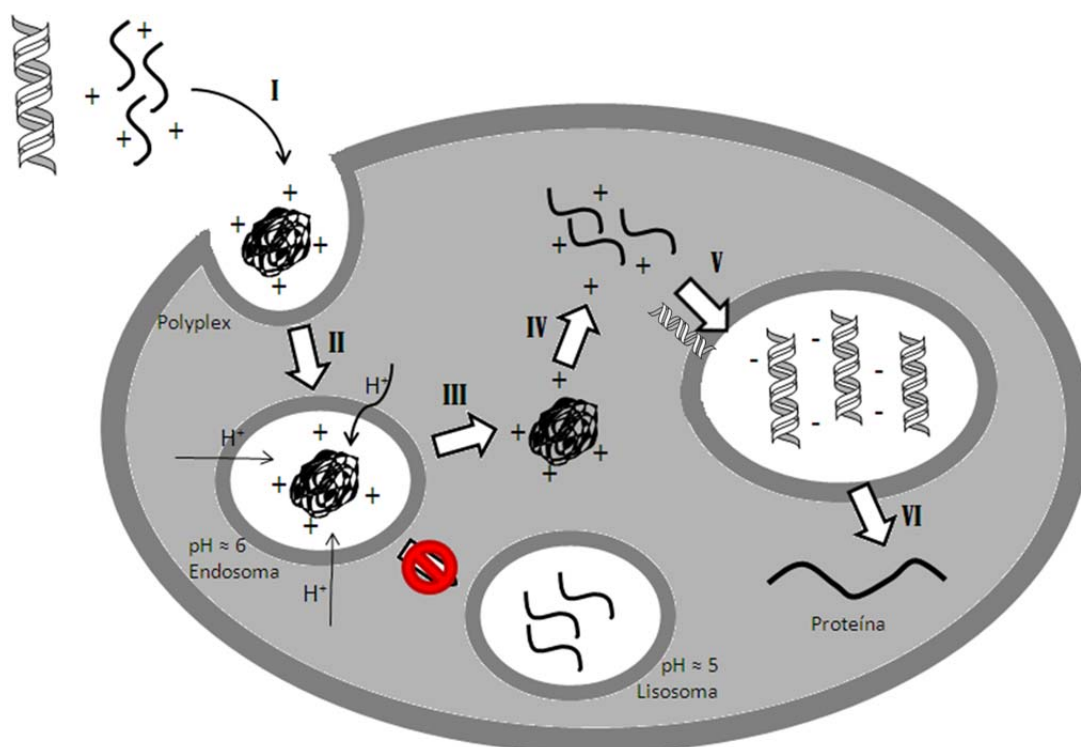
En este capítulo, una vez sintetizados y caracterizados estructuralmente los monómeros y polímeros de estudio, se describe la evaluación de su eficiencia de transfección y citocompatibilidad *in vitro*. Para ello, el primer paso será evaluar su capacidad de interactuar con el ADN plasmídico, formando los correspondientes complejos polielectrolíticos o *polyplexes*, que permitan condensar el material genético hasta un tamaño apropiado para la internalización celular, además de protegerlo de las enzimas nucleolíticas y demás factores del medio tanto intra como extracelular que podrían degradarlo.

Los diferentes copolímeros preparados en este trabajo incorporan en diferentes proporciones dos tipos de aminas terciarias así como unidades neutras como HPMA o derivados glucosídicos de diferente naturaleza. Estas variables estructurales van a influir en parámetros como capacidad de carga de ADN, tamaño del *polyplex*, carga superficial del mismo, estabilidad del mismo en medios biológicos, protección del ADN, la ruta que seguirán para internalización celular, la eficiencia de esta internalización, así como la facilidad de liberación intracelular del ADN, entre otros. Teniendo en mente que estos sistemas han sido evaluados en cultivos celulares *in vitro*, en este capítulo se ha hecho un esfuerzo por relacionar la estructura y dicha respuesta celular *in vitro* en términos de viabilidad y transfección. En los siguientes párrafos de esta introducción, en cualquier caso, se va a intentar contextualizar la posible relevancia del diseño estructural propuesto de una forma más global como puede ser una supuesta aplicación clínica, haciendo una descripción del ‘viaje’ del vector desde su administración parenteral hasta su expresión en el núcleo de la célula diana.

Para llevar a cabo el proceso de transfección en una aplicación clínica, de forma ideal los vectores deberían ser liberados directamente en el tejido deseado; sin embargo, como se ha mencionado en la **Introducción general** de la presente tesis doctoral, los *polyplexes* deben recorrer un largo camino desde su introducción en el organismo, normalmente mediante inyección en el torrente sanguíneo (**figura 3.1**), donde se encuentran con los primeros obstáculos en su camino, siendo uno de los más importantes la anteriormente descrita barrera endotelial<sup>1-3</sup>. Además, los vectores de naturaleza catiónica presentan numerosas interacciones inespecíficas con componentes del torrente sanguíneo, como las células sanguíneas, o el endotelio de los vasos, dando lugar a una vida media muy corta de estos complejos en sangre, ya que pueden, además, interactuar con proteínas del plasma como la albúmina o las inmunoglobulinas y activar los componentes del complemento. Estas interacciones con proteínas del plasma son omnipresentes *in vivo*, y la proteína mayoritaria del suero, la albúmina, es la principal responsable de la rápida eliminación de los complejos del torrente sanguíneo. Se ha demostrado que esta interacción forma complejos terciarios que dan lugar a la formación de grandes agregados, que son rápidamente eliminados, principalmente

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

endocitados por células del hígado, o simplemente se acumulan en los capilares. Debido a estos factores, las primeras generaciones de vectores no víricos tipo poliamina no tenían realmente mucha utilidad debido a su rápida eliminación del torrente sanguíneo, o a su acumulación inespecífica en tejidos u órganos. Los vectores estudiados en este trabajo incorporan, desde una aproximación 'bottom-up', unidades neutras anfifílicas distribuidas estadísticamente a lo largo de las cadenas, las cuales van a reducir la carga positiva aparente de los *polyplexes*, y pueden aumentar la estabilizar los complejos 'disfrazándolos' biológicamente reduciendo su interacción con componentes biológicos, tal y como hace el PEG en los derivados PEGilados<sup>1-2</sup>.



**Figura 3.1.** Barreras, a nivel celular, que el complejo polímero catiónico-ADN (*polyplex*) debe superar para llevar a cabo el proceso de transfección. Un sistema de liberación de genes debe tener la capacidad de (I) compactar de forma eficiente el material genético a utilizar; (II) entrar en la célula; (III) escapar del endo-lisosoma (en esta figura se ha representado el escape del lisosoma mediante la acción de la 'esponja de protones', que se explica más adelante en el texto), y (IV) permitir la liberación del ADN de su interacción con el vector polimérico. Este ADN una vez libre (V), debe poder desplazarse hasta llegar al núcleo, donde finalmente, se expresará el gen terapéutico (VI). (Modificado de S. Y. Wong *et al*<sup>1</sup>)

Finalmente, si han logrado superar con éxito estas barreras a nivel sistémico, y los *polyplexes* logran llegar a la célula diana, todavía deben enfrentarse a nuevos obstáculos antes de llegar al núcleo celular. El primer obstáculo que encuentran para entrar en la célula es la membrana plasmática, que no pueden atravesar por simple difusión. Se cree que los complejos interaccionan de forma inespecífica con la membrana plasmática, mediante simple interacción electrostática con los grupos cargados negativamente de los glucosaminoglucanos presentes



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

en ésta. La posterior entrada de los complejos en la célula se realiza en la mayoría de los casos mediante endocitosis, un proceso altamente controlado, ya que es vital para la célula evitar la entrada de sustancias indeseadas o innecesarias. El proceso intracelular que sufren estos sistemas es diferente en cada caso y los factores que determinan el proceso todavía no están claros, pero influyen claramente la eficiencia del proceso de transfección. La eficiencia de este proceso se puede mejorar complejando el polímero con un ligando de algún receptor específico localizado en la membrana celular, lo que además aportaría especificidad al proceso, si este receptor es expresado únicamente por una determinada línea celular. Otro factor a tener en cuenta para la internalización celular es el tamaño de las partículas que queremos internalizar, siendo el tamaño óptimo cercano a 200 nm. Como se ha mencionado antes, los complejos que mejores resultados han ofrecido en este estudio tienen tamaños entre 50 y 200 nm por lo que se ajustan, al menos algunos de ellos, a este requisito de tamaño. Además, se han preparado copolímeros con derivados de glucosa, los cuales pueden interaccionar con lectinas de membrana, o con derivados de CD (permetilada y no permetilada), la cual se ha descrito capaz de interaccionar con el colesterol de membrana<sup>1-7</sup>.

Si la internalización ha sido llevada a cabo mediante endocitosis, los complejos quedan incluidos dentro de una vesícula endosomal o endosoma que se acidifica convirtiéndose en un lisosoma o fagosoma. Para evitar la degradación de los complejos en estas condiciones se han desarrollado numerosas estrategias, siendo la más común la utilización de polímeros que contienen un gran número de aminas secundarias y terciarias que intervienen en el mecanismo conocido como ‘esponja de protones’, que ya ha sido descrita en la **Introducción general** de esta tesis doctoral<sup>1-2, 8-10</sup>, y a la cual se ajustan las aminas terciarias usadas en este estudio.

Una vez superada esta barrera, el ADN debe liberarse, para a continuación entrar en el núcleo y expresarse. Esta liberación, es decir, la disociación del complejo antes de llegar hasta el núcleo, puede determinar en gran medida la eficiencia del proceso de transfección, y depende en gran medida del tipo de vector utilizado. Se ha visto que en los casos de transfección mediante *lipoplexes* (complejos formados por ADN y sustancias lipídicas), el DNA llega libre hasta el núcleo, mientras que en muchos casos estudiados con *polyplexes*, el complejo puede permanecer unido tras la entrada en el núcleo. De cara a facilitar la disociación del complejo y liberación del ADN, en la literatura aparecen reflejadas numerosas estrategias para reducir la estabilidad de la interacción polímero/ADN, principalmente reduciendo el número de cargas positivas, reduciendo su peso molecular, o mediante conjugación con cadenas de PEG o HPMA. En este trabajo la incorporación de las unidades neutras anfífilas como el mencionado HPMA va a facilitar este proceso ya que su distribución estadística a lo largo de las cadenas hace que el apantallamiento de las cargas positivas sea más efectivo. En cualquier caso, ADN libre en el citosol se enfrenta a un ambiente físico y metabólicamente hostil debido principalmente a la presencia de enzimas nucleolíticas. Existe además una densa red formada por el citoesqueleto, que dificulta enormemente la difusión de fragmentos de ADN mayores de 250 pb (85 nm).

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Finalmente, este ADN aún debe superar una última barrera, la membrana nuclear. Debido a que el genoma y la maquinaria nuclear son vitales para todas las funciones celulares, el núcleo se encuentra aislado tras una doble bicapa lipídica con poros muy estrechos y con un sofisticado sistema de regulación del transporte de biomoléculas, siendo necesario el transporte activo mediante proteínas transportadoras para moléculas mayores de 20 kDa, normalmente proteínas citosólicas destinadas al núcleo celular que contienen la secuencia aminoacídica NLS (*nuclear localization signal*). Otra estrategia para superar esta barrera consiste en aprovechar la ruptura de la membrana nuclear durante la división celular (la eficiencia de transfección inmediatamente antes de la división celular es 30-500 veces superior)<sup>1, 9-11</sup>. Una vez llegado al núcleo, el ADN debe expresar el gen marcador (*reporter gene*) o el gen terapéutico de interés que lleva codificado. Esta expresión puede ser transitoria, si solamente se produce una retención episomal del ADN, generalmente plasmídico, dentro del núcleo donde éste se replica y transcribe. En los primeros vectores de tipo poliamina solamente llegaba a transcribir un 0,1-0,001% del ADN plasmídico que entraba en el citoplasma<sup>2, 12-14</sup>.

A modo de resumen de todo lo anterior, en la presente tesis doctoral se han sintetizado diferentes vectores no virales de naturaleza polimérica, con ciertas propiedades que les pueden permitir sortear y superar los numerosos obstáculos que encuentran a lo largo de este viaje con el objetivo final de mejorar la eficiencia de todo este proceso. Por una parte, se han diseñado los monómeros catiónicos capaces de complejar el ADN plasmídico mediante interacciones electrostáticas, además de interactuar con la membrana plasmática, facilitando la entrada de los *polyplexes* en la célula. La utilización de aminas terciarias no sólo permitirá reducir la carga positiva de estos complejos, reduciendo así su toxicidad e interacciones inespecíficas durante su viaje hasta la célula diana en comparación con la utilización de aminas primarias o secundarias, sino que también se espera que participen en la 'esponja de protones' incrementando la eficiencia de transfección. Por otra parte, los monómeros neutros y anfifílicos, como se ha mencionado varias veces a lo largo de la presente tesis doctoral, tienen como objetivo ofrecer estabilidad en biodistribución (estabilidad en torrente sanguíneo y minimización de interacciones con componentes biológicos) y aumentar la citocompatibilidad de estos sistemas, reduciendo la carga superficial de los complejos, facilitando de este modo, además, la liberación del ADN plasmídico del complejo polielectrolítico una vez que éste ha sido internalizado en la célula. Además, en el caso específico de los monómeros glucosídicos, puede ocurrir que estos aporten interacciones específicas con la membrana plasmática<sup>4-7</sup>. Ambas unidades, las catiónicas y las neutras, han sido copolimerizadas simultáneamente en parejas tal como se ha descrito en el anterior capítulo, en diferentes proporciones molares, obteniendo copolímeros con distintas proporciones de éstas, y, por tanto, con diferentes propiedades.

En este trabajo se han evaluado en el estudio celular *in vitro* tanto la viabilidad celular como la capacidad de transfección, estando ambos inter-relacionados. La hipótesis más aceptada acerca de la alta toxicidad mostrada por los sistemas catiónicos postula que ésta es

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

debida a interacciones electrostáticas entre los dominios aniónicos de la superficie celular y los dominios catiónicos presentes en el transportador, que darían lugar a agregados que se acumularían en la superficie celular impidiendo su correcto funcionamiento, produciendo la muerte de la célula<sup>1-2, 15-16</sup>. Para intentar solventar este problema una de las estrategias más ampliamente documentadas en la literatura se basa en la utilización de diferentes entidades neutras anfifílicas como el HPMA, el PEG, y diferentes polisacáridos, que debido a su naturaleza hidrofílica, y no iónica, han demostrado una gran solubilidad y un bajo número de interacciones con componentes celulares y del suero sanguíneo, mediante la formación de una envoltura hidrofílica que enmascara de una forma efectiva la polaridad de la molécula transportada. Por tanto, como se ha mencionado, se ha analizado de forma conjunta la influencia de la incorporación de las unidades neutras (HPMA o derivados glucosídicos) a lo largo de la cadena, tanto en la eficiencia de transfección como en la citotoxicidad. Se describe además una vía de marcaje fluorescente de los vectores poliméricos que puede ser usada en el futuro para hacer un seguimiento localización de estos polímeros y aclarar algunos de los aspectos mencionados en esta Introducción (interacción con membranas, localización intracelular, etc).

Hay que señalar que los copolímeros poli(EPA-co-HPMA), los primeros que se estudiaron en esta tesis, se evaluaron con un protocolo diferente al resto, debido a que este estudio se llevó utilizando los protocolos habituales de trabajo en el *Network of Excellence of Functional Biomaterials (NFB)*, perteneciente a la Universidad Nacional de Irlanda. El resto de los estudios se llevaron a cabo posteriormente en el *Instituto de Estudios Biofuncionales (IEB)* de la Universidad Complutense de Madrid, en el que se puso a punto un método de trabajo diferente debido a que por una parte se cambiaron algunas condiciones iniciales no optimizadas y por otra se tuvo que hacer un esfuerzo de adaptación a las instalaciones y la experiencia del nuevo grupo colaborador. Como consecuencia de todo ello, los estudios, y por tanto, los resultados, de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) no son directamente comparables con los polímeros derivados de Ta y HPMA aunque sí se ha podido hacer un análisis conjunto final y se han podido extraer conclusiones comunes.

A pesar de las diferencias existentes en los protocolos de trabajo utilizados, en todos los casos se llevó a cabo el mismo procedimiento. Una vez determinada la capacidad de complejación de los polímeros, así como el tamaño de partícula y carga superficial de los *polyplexes*, los estudios celulares *in vitro* fueron llevados a cabo incubando las células con los *polyplexes* durante 4 horas en medio de cultivo DMEM sin suero. La utilización de medio de cultivo libre de suero permite evitar posibles interacciones inespecíficas con las proteínas de éste. Una vez pasado este tiempo, suficiente para llevar a cabo la internalización de los complejos por parte de las células, este medio de cultivo fue reemplazado por medio de cultivo completo para permitir el correcto crecimiento del cultivo celular, durante 48 horas de incubación. Una vez pasado este tiempo se tomó este medio de cultivo, donde se encuentra libre la luciferasa codificada por nuestro gen marcador, y se llevó a cabo la medida de la

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

luminiscencia tras la adición de su correspondiente sustrato. Debido a que la luciferasa es excretada al medio, las células transfectadas pudieron ser recuperadas y utilizadas en el ensayo de viabilidad celular con calceína, inmediatamente después del ensayo de transfección. En el caso de los sistemas EPA-HPMA se llevó a cabo un ensayo de actividad metabólica en presencia de los polímeros libres en disolución utilizando el reactivo comercial Alamar Blue.

Finalmente, es necesario indicar que los experimentos llevados a cabo para evaluar estos polímeros como posibles vectores no virales se han llevado a cabo *in vitro*, poniendo directamente en contacto los complejos polielectrolíticos polímero/ADN con las células diana, eliminando como se ha dicho antes, el suero del medio de cultivo para evitar cualquier tipo de interacción inespecífica entre los *polyplexes* y las proteínas presentes en él. Por lo tanto, en el caso de encontrar algún sistema polimérico que ofrezca resultados prometedores, sería necesario llevar a cabo experimentos *in vivo* en un futuro. La utilización de un organismo modelo, permitirá estudiar su comportamiento en el torrente sanguíneo, y si estos complejos son capaces de superar las barreras existentes tanto a nivel sistémico como a nivel intracelular, evaluando al mismo tiempo la citocompatibilidad de los mismos, un aspecto crítico para su posible aplicación en terapia génica<sup>22-23</sup>.

### 3.2. Materiales y métodos

#### 3.2.1. Reactivos

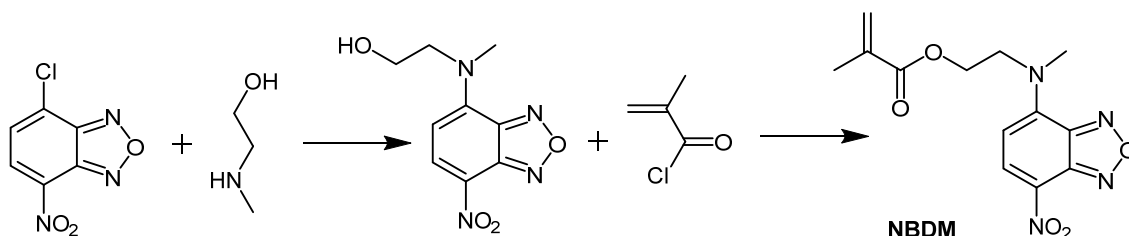
En este trabajo se ha utilizado el plásmido pCMV-GLuc (New England Biolabs), de aproximadamente 6000 pb de longitud, que codifica el gen de la luciferasa del copépodo *Gaussia princeps*, controlado por un promotor constitutivo. Este gen fue utilizado como gen marcador (*reporter gene*) para evaluar la eficiencia de transfección de nuestros polímeros de forma indirecta. Este plásmido fue amplificado en *Escherichia coli* BL21 y purificado mediante Maxi-prep siguiendo los procedimientos habituales. Su pureza fue evaluada mediante espectroscopía UV, utilizándose en este estudio una relación  $E_{260nm}/E_{280nm}$  cercana a 1,87-1,89.

Para este estudio se utilizaron 2 líneas celulares: fibroblastos embrionarios Swiss 3T3 (CCL-92, ATCC), y células epiteliales de origen tumoral B16 (F1, ATCC), ambas procedentes de ratón. Estas líneas celulares fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). Los pases se realizaron semanalmente usando tripsina, manteniendo los cultivos celulares a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2. Síntesis del metacrilato de 2-(metil(7-nitrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4-il)amino)etilo (NBDM)

NBDM (**figura 3.2**) fue sintetizado según el protocolo de R. S. Jardine *et al*<sup>17</sup>. A una disolución de 2,52 g (30 mmol) de hidrogenocarbonato de sodio y 0,74 g (9,9 mmol) de 2-(metilamino)etanol en 20 mL de agua, se le añadieron 1,99 g (10 mmol) de cloruro de nitrobenzoxadiazol, previamente disuelto en 80 mL de metanol. La reacción tuvo lugar a 55 °C durante 3 horas, en agitación. Tras este tiempo, el metanol fue eliminado mediante presión reducida, y la mezcla de reacción fue enfriada hasta temperatura ambiente, y acidificada hasta pH 1,5 mediante la adición de HCl 1 M. En estas condiciones el producto, de color naranja intenso, precipitó y a continuación fue filtrado y lavado con agua destilada, que fue eliminada a presión reducida. En el siguiente paso, 0,45 g (1,8 mmol) de este producto y 0,6 mL (4,3 mmol) de trietilamina, fueron disueltos en 10 mL de tetrahidrofurano, La mezcla de reacción se enfrió hasta 0 °C, mientras se añadían 0,5 mL (5,1 mmol) de cloruro de metacrililo, mediante goteo y bajo agitación. La reacción fue mantenida durante 24 horas a temperatura ambiente, y el tetrahidrofurano fue finalmente eliminado a vacío. El producto final fue recrystalizado en una mezcla tetrahidrofurano-etanol (80:20) y precipitado en éter. El rendimiento obtenido fue cercano al 70%.

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 8,43 (d, 1H, J=9 Hz), 6,16 (d, 1H, J=9 Hz), 5,91 (s, 1H), 5,52 (s, 1H), 4,57-4,41 (m, 4H), 3,49 (s, 3H), 1,81 (s, 3H).



**Figura 3.2.** Síntesis del monómero metacrílico fluorescente NBDM.

### 3.2.3. Formación y caracterización de los complejos polielectrolíticos polímero/ADN

Los complejos polielectrolíticos polímero/ADN (*polyplexes*) fueron preparados a distintas relaciones polímero/ADN. En el caso del sistema Ta-HPMA y de los polímeros glucosídicos se usaron relaciones molares de cargas N/P, refiriéndose N a la amina terciaria del monómero catiónico y P a los grupos fosfato de las bases nitrogenadas de la cadena de ADN.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

En el caso de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) las relaciones polímero/ADN van desde 2/1 hasta 20/1, en peso, con una concentración final de 1 µg de ADN en 100 µL de disolvente. La formación de los complejos fue llevada a cabo mediante la mezcla de una disolución (500 µg/mL) del correspondiente polímero y una disolución del plásmido estudiado (200 µg/mL) usando PBS (tampón salino, pH 7,4) como disolvente. Esta mezcla fue mantenida a temperatura ambiente y sin agitación durante 1 h para permitir la formación de los complejos mediante interacción electrostática.

En el caso de los polímeros derivados de TEDETA, y de los polímeros glucosídicos, las relaciones N/P van desde 1/1 hasta 8/1, en proporción molar, con una concentración final de 1 µg de ADN en 100 µL de disolvente. La formación de los complejos fue llevada a cabo mediante la mezcla de una disolución (500 µg/mL) del correspondiente polímero y una disolución del plásmido estudiado (200 µg/mL) usando agua destilada como disolvente. Esta mezcla fue mantenida a temperatura ambiente y sin agitación durante 1 h para permitir la formación de los complejos mediante interacción electrostática.

#### **Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis de los polímeros dendrónicos fue llevada a cabo en un gel al 0,9% (p/v) de agarosa, en presencia de bromuro de etidio (EtBr) y la migración se realizó aplicando 100V durante 30 minutos. El patrón de pesos moleculares λ-HindIII (1 µg), fue usado como control.

#### **Medida del tamaño de partícula y determinación de la carga en superficie (Potencial ζ)**

El tamaño de los complejos fue determinado mediante medidas de dispersión de luz (DLS) (NanoZS Malvern Instruments), y su carga en superficie (Potencial ζ) fue medida usando un Zetamaster System (Malvern Instruments). Los *polyplexes* derivados de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) fueron preparados añadiendo 25 µg de ADN en 800 µL de tampón salino (PBS, pH 7,4). Las muestras de los derivados de TEDETA y de los polímeros glucosídicos fueron preparadas añadiendo 10 µg de ADN en un volumen final de 800 µL de agua destilada. Además, para cada serie de polímeros, se prepararon también algunas muestras utilizando una disolución tampón a pH 5 (pH lisosomal) formulado a base de sales de fosfato. En todos los casos cada medida fue realizada por triplicado, a 25 °C, dejando 1 minuto de equilibrado antes de cada medición. El tiempo de adquisición fue de 300-600 segundos para cada muestra<sup>18-19</sup>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### 3.2.4. Respuesta celular con HPMA. Transfección y citocompatibilidad

##### 3.2.4.1. Eficiencia de transfección y actividad metabólica *in vitro* de los polímeros derivados de EPA y HPMA

###### Estudio de transfección *in vitro*

Para este estudio se utilizaron fibroblastos Swiss 3T3 de ratón, cultivados en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Sigma-Aldrich), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). Los pases se realizaron semanalmente usando tripsina.

Los complejos polielectrolíticos fueron preparados a diferentes relaciones polímero/plásmido, en peso, desde una relación 1/1 hasta una relación final 20/1, utilizando medio de cultivo DMEM sin suero como disolvente. Como control positivo de transfección se utilizaron complejos formulados con poli(L-lisina) (PLL), lineal de 70-150 kDa (Sigma-Aldrich) y el plásmido en las mismas condiciones. Como control negativo se utilizaron células sin tratar y células tratadas con ADN desnudo.

Para llevar a cabo la transfección, se sembraron 20000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos, y fueron incubadas durante 24 horas, a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, el medio de cultivo de cada pocillo fue sustituido por 100 µL (1 µg de ADN) de la correspondiente solución de complejo polímero/ADN en medio de cultivo sin suero, con la que se incubaron durante 4 horas. Tras este tiempo de incubación con los *polyplexes*, el medio fue retirado de cada pocillo y sustituido por medio de cultivo completo, con el que fueron incubadas durante 48 horas, a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las muestras se sembraron y midieron por triplicado. Finalmente, el medio de cultivo fue recolectado, y el ensayo fue realizado utilizando el kit comercial BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del proveedor. La expresión de luciferasa fue cuantificada con un lector de placas VICTOR3 V (Multilabel Counter, Perkin Elmer BioSignal Inc.)<sup>19</sup>.

###### Determinación de la actividad metabólica *in vitro*

La actividad metabólica frente a la presencia de los polímeros de estudio fue determinada mediante el ensayo con el reactivo comercial Alamar Blue (Biosource International, Invitrogen). En esta determinación se estudiaron disoluciones de polímero libre, incluyendo PLL como control, en el medio de cultivo DMEM sin suero. Se comenzó realizando una disolución madre de polímero (2,5 mg/mL) que fue sucesivamente diluida, utilizando más medio de cultivo como disolvente. Todas las muestras se sembraron y midieron por triplicado.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Tras incubar las células durante 4 horas en presencia de la disolución de polímero, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo, siendo reemplazado por medio de cultivo completo, con el que las células fueron incubadas durante 48 horas. Pasado este tiempo, el medio fue sustituido por una solución del reactivo Alamar Blue al 10% en *Hank's Balanced Salt Solution* (Sigma-Aldrich). Tras 3 horas de incubación a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>, la absorbancia de cada muestra fue medida a 550 y 595 nm usando un lector de placas VICTOR3 V. El porcentaje de reducción de *Alamar Blue* fue calculado usando el factor de correlación R<sub>0</sub> indicado por el proveedor.

#### 3.2.4.2. Eficiencia de transfección y citocompatibilidad *in vitro* de los polímeros derivados de Ta, Te y HPMA

##### Estudio de transfección *in vitro*

Para este estudio se utilizaron fibroblastos Swiss 3T3 de ratón, cultivados en medio de cultivo DMEM (Gibco), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). Los pases se realizaron semanalmente usando tripsina/EDTA y el cultivo fue incubado a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

En este estudio se prepararon diferentes relaciones molares polímero/plásmido (N/P), desde una relación 1/1 hasta una relación final 8/1, utilizando medio de cultivo DMEM sin suero como disolvente. Como control positivo de transfección se utilizaron complejos formulados con polietilenimina (PEI) hiperramificada de 25 kDa (Sigma-Aldrich) y el plásmido en las mismas condiciones. Como control negativo se utilizaron células sin tratar y células tratadas con ADN desnudo.

Para llevar a cabo la transfección, se sembraron 10000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos, que fueron incubadas durante 24 horas, a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo, el medio de cultivo de cada pocillo fue sustituido por 100 µL (1 µg de ADN) de la correspondiente solución de complejo polímero/ADN en medio de cultivo sin suero, con la que se incubaron durante 4 horas. En el caso del copolímero Te<sub>50</sub> también se realizó una incubación de 24 horas con los *polyplexes* en medio sin suero. Tras este tiempo de incubación con los *polyplexes*, el medio fue retirado de cada pocillo y sustituido por medio de cultivo completo, con el que fueron incubadas durante 48 horas, a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Todas las muestras fueron sembradas y medidas por triplicado. Finalmente, el medio de cultivo fue recolectado, y el ensayo fue realizado utilizando el kit comercial BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit siguiendo las instrucciones del proveedor. La expresión de luciferasa fue cuantificada con un lector de placas BioTek Synergy HT (Biotek Instruments).



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### Determinación de la citotoxicidad y proliferación celular *in vitro*

La viabilidad celular de los cultivos fue determinada tras los experimentos de transfección mediante un ensayo con Calceína AM (Molecular Probes). Esta molécula fluorescente es internalizada a través de la membrana plasmática de las células vivas, siendo por tanto un marcador de viabilidad celular.

Una vez realizado el estudio de transfección, los restos de medio de cultivo fueron retirados, y tras varios lavados con PBS, se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de calceína (4  $\mu$ g/mL) a cada pocillo, con la que las células fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, la absorbancia ( $\lambda_{ex}$  495 nm,  $\lambda_{em}$  515 nm) de cada pocillo fue medida usando un lector de placas BioTek Synergy HT. Los resultados fueron normalizados respecto a las células sin tratar (100% de viabilidad).

#### 3.2.5. Respuesta celular con los monómeros derivados de EPA, $\alpha$ -glucosa y $\beta$ -ciclodextrina. Determinación de su eficiencia de transfección y citocompatibilidad *in vitro*

Para este estudio se utilizaron fibroblastos Swiss 3T3 y células epiteliales de origen tumoral B16, siendo ambas líneas procedentes de ratón. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (Gibco), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S). Los pases se realizaron semanalmente usando tripsina/EDTA y ambas líneas celulares fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>.

El ensayo de transfección fue realizado en idénticas condiciones a las descritas para el estudio con los polímeros dendrónicos. Se prepararon diferentes relaciones molares N/P, desde 1/1 hasta una relación final 8/1, utilizando medio de cultivo DMEM sin suero como disolvente. Como control positivo de transfección se utilizó PEI hiperramificada de 25 kDa, y como control negativo se utilizaron células sin tratar y células tratadas con ADN desnudo. Para llevar a cabo la transfección, se utilizaron fibroblastos Swiss 3T3 y células tumorales B16 en idénticas condiciones. Se sembraron 10000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos, que fueron incubadas durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo de cada pocillo y fue reemplazado por 100  $\mu$ L (1  $\mu$ g de ADN) de la correspondiente solución de complejo polímero/ADN en medio de cultivo sin suero. Tras incubar las células en estas condiciones durante 4 horas el medio de cultivo de cada pocillo fue sustituido por medio de cultivo completo, con el que fueron incubadas durante 48 horas. Finalmente, el medio de cultivo fue recolectado, y el ensayo fue realizado utilizando el kit comercial BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit siguiendo las instrucciones del proveedor. La expresión de luciferasa fue cuantificada con un lector de placas BioTek Synergy HT (Biotek Instruments).

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### Determinación de la citotoxicidad y proliferación celular *in vitro*

El ensayo citocompatibilidad fue realizado utilizando calceína, también en idénticas condiciones a las descritas para el estudio con los polímeros dendrónicos, añadiendo la disolución de calceína a cada pocillo, con la que las células fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda y con un 5% de CO<sub>2</sub>. La absorbancia ( $\lambda_{\text{ex}}$  495 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  515 nm) de cada muestra fue registrada con ayuda de un lector de placas BioTek Synergy HT. Los resultados fueron normalizados respecto a las células sin tratar (100% de viabilidad).

### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Copolímeros con HPMA

Como se ha mencionado en la **Introducción** de este capítulo, cada uno de los dos sistemas con HPMA ha sido evaluado en un laboratorio diferente y con distinto protocolo. Así, los copolímeros poli-(EPA-co-HPMA) se evaluaron en el *Network of Excellence of Functional Biomaterials (NFB)* en Irlanda utilizando relaciones vector/ADN en peso según el protocolo establecido en este grupo. Se estudió la viabilidad celular de los vectores aislados (sin ADN) usando Alamar Blue. El reactivo Alamar Blue es un indicador para la determinación de la actividad metabólica de un cultivo celular basado en la capacidad natural que poseen las células vivas de reducir el ingrediente activo de este reactivo, la resazurina, en una molécula llamada resofurina, cuya fluorescencia puede ser medida, obteniendo de este modo una medida cuantitativa, que debe ser normalizada respecto a los valores obtenidos por las células no tratadas o células control<sup>20</sup>. Como control positivo de transfección se utilizó PLL.

El sistema Ta-HPMA (y Te-HPMA) se estudió, en cambio, en el *Instituto de Estudios Biofuncionales (IEB)* de la Universidad Complutense en Madrid. Para estos estudios, posteriores a los del sistema EPA-HPMA, se eligió el mismo modelo celular y el mismo plásmido que para dicho sistema, pero se implementaron ciertas modificaciones (descritas a continuación) para hacer un estudio más coherente y más ajustado a la experiencia del *Grupo de Ingeniería de Tejidos* con el que se colabora. Así, se eligió PEI hiperramificada de 25 kDa como control positivo debido a su mayor similitud estructural con las estructuras Ta y Te. Se llevó a cabo el estudio usando relaciones molares de carga N/P en vez de en peso para facilitar el análisis de balance de carga comparativo entre las diferentes composiciones. Se evaluó la citotoxicidad de los complejos y no de los polímeros como en el sistema anterior ya que la viabilidad celular en respuesta al complejo como tal puede explicar algunos de los resultados de transfección. Además, se usó un ensayo con calceína, el cual puede proporcionar una medida de la viabilidad celular más exacta que la medida indirecta obtenida con el ensayo de Alamar Blue<sup>27-28</sup>, que sólo nos ofrece una medida indirecta, a través de la actividad metabólica del cultivo. Finalmente, el análisis de la formación de complejos mediante DLS se llevó a cabo en agua destilada y no en PBS debido a la dificultad mostrada por los polímeros EPA-HPMA

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

para realizar las medidas en medio con sales, donde se obtuvieron medidas con grandes desviaciones, requiriendo grandes cantidades de plásmido para tal fin. Debido a ello se decidió utilizar agua destilada como disolvente, que a pesar de ofrecer menor similitud con el medio de cultivo donde se realizarán los ensayos biológicos<sup>21</sup>, permitió utilizar unas cantidades de plásmido asequibles, tanto a nivel de amplificación como de purificación, mediante técnicas convencionales de biología molecular. El tamaño de partícula de los complejos polielectrolíticos en un medio con una pequeña concentración de sales suele ser mayor al obtenido en agua destilada<sup>30</sup>. En los resultados obtenidos en este estudio usando la disolución salina a pH 5 no se encontraron diferencias significativas de tamaño con las muestras medidas en agua destilada.

Debido a estas diferencias entre ambos protocolos, las evaluaciones de los dos sistemas no son directamente comparables por lo que se describen independientemente. Sin embargo, sí se ha podido hacer una puesta en común conjunta que se recoge en el **apartado 3.3.1.3.**

#### 3.3.1.1. Polímeros derivados de EPA y HPMA

Los análisis de tamaño de partícula y potencial  $\zeta$  (**figuras 3.3a y 3.3b**) de los *polyplexes* obtenidos con diferentes relaciones en peso polímero/ADN fueron realizadas por triplicado. Los copolímeros EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub> no fueron capaces de complejar el ADN plasmídico, presentando valores de potencial  $\zeta$  negativos y tamaños de partícula cercanos a los del plásmido sin complejar, superiores a 500 nm. Estos datos no se han representado en esta tesis doctoral con el objetivo de simplificar la representación gráfica de los resultados. Los resultados de los otros copolímeros capaces de complejar ADN (EPA<sub>50</sub>, EPA<sub>70</sub> y EPA<sub>90</sub>) muestran que todos los complejos poseen un tamaño de partícula comprendido entre los 50 y 200 nm, considerado el óptimo para la internalización celular. Además, los valores de potencial  $\zeta$  (cercanos o superiores a +20 mV) indican que los complejos son estables en disolución. Un resultado interesante es la carga negativa del complejo 2/1 con el copolímero EPA<sub>90</sub>. Siendo este copolímero el que posee una mayor densidad de carga de los tres evaluados (esta relación en peso corresponde aproximadamente a una relación de cargas N/P de 1,6/1) este resultado sugiere que en este caso no todas las cargas positivas son efectivas en la complejación, probablemente debido a que la alta densidad de las mismas y la repulsión electrostática entre unidades vecinas hace que las cadenas no puedan adoptar conformaciones compatibles con una alta cancelación de cargas con el ADN. Este hecho puede ocasionar para este sistema a esta relación una eficiencia en la carga de ADN inferior a las otras composiciones.

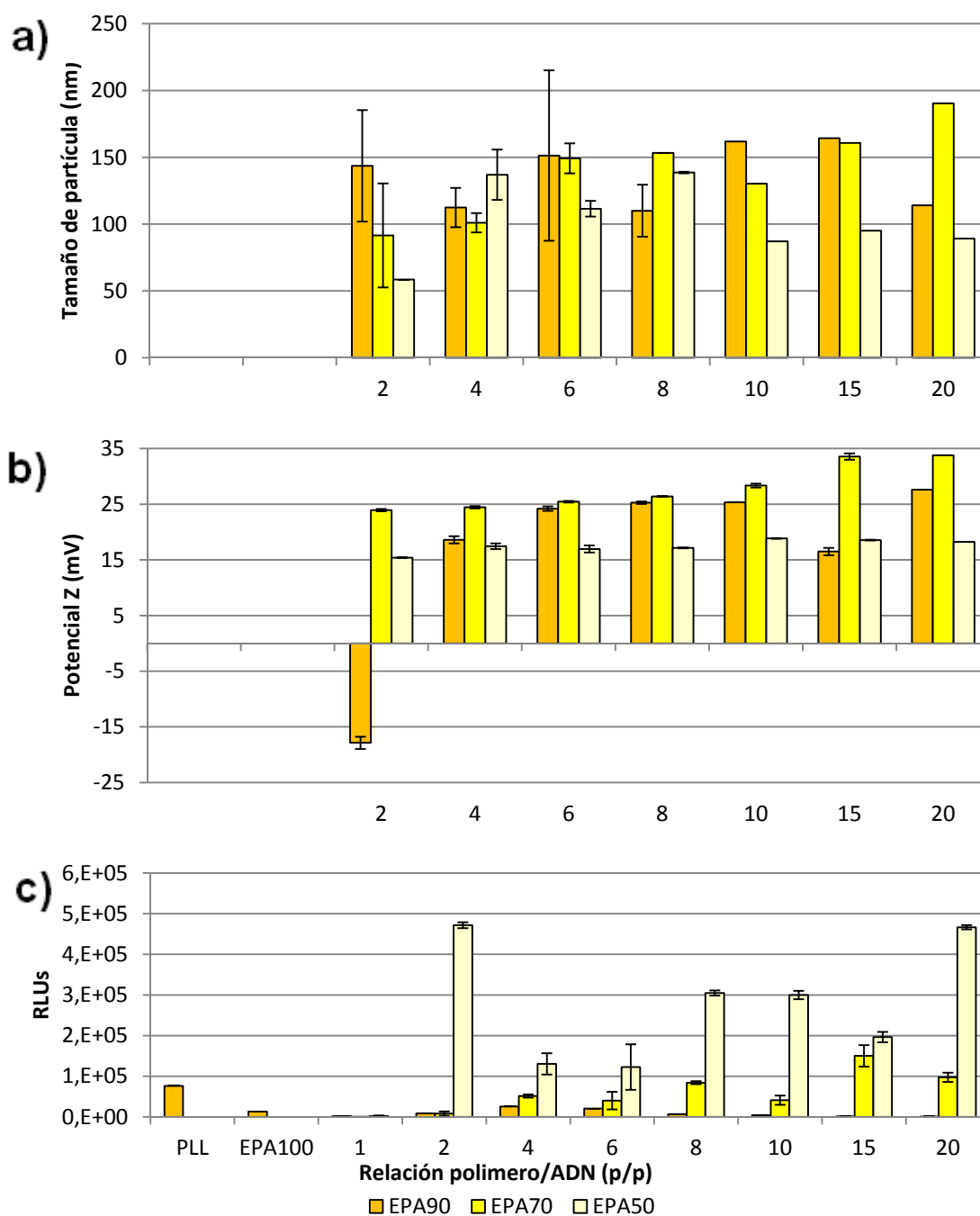
Las células fueron incubadas junto a los *polyplexes* durante 4 horas en ausencia de suero, tiempo suficiente para la internalización de los *polyplexes* en las células, y posteriormente incubadas durante 2 días en medio de cultivo completo. Tras este tiempo, las medidas de luminiscencia fueron realizadas. Células no tratadas y células transfectadas con

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

ADN desnudo fueron utilizadas como controles negativos. Las mediciones de luminiscencia obtenidas por las células tratadas con ADN desnudo fueron idénticas a las obtenidas con las células sin tratar, debido a que este ADN es rápidamente degradado por acción de las nucleasas citosólicas<sup>22</sup>, por ello no han sido representadas en este trabajo. Los complejos formados con PLL y EPA<sub>100</sub> fueron utilizados como control positivo de transfección, representándose en la **figura 3.3c** sólo sus mejores niveles de transfección. Los copolímeros EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub> no fueron utilizados en este ensayo de transfección debido a su mencionada incapacidad de complejar el ADN plasmídico. En esta **figura 3.3c** se puede observar que el copolímero EPA<sub>50</sub> muestra los mayores niveles de transfección en todas las relaciones estudiadas, mientras que el copolímero EPA<sub>90</sub> presenta muy bajos niveles de transfección (presentando los mayores niveles en las relaciones intermedias 6/1 y 8/1) y el copolímero EPA<sub>70</sub> presenta niveles de transfección bajos aunque superiores a EPA<sub>90</sub>, siendo las mejores relaciones las más altas, 15/1 ó 20/1.

El sistema EPA<sub>50</sub>, que es claramente superior, se caracteriza por ser el que posee menor proporción del monómero catiónico EPA de los tres copolímeros evaluados capaces de complejar. Es destacable que este copolímero EPA<sub>50</sub> presenta para casi todas las relaciones los menores tamaños y los valores de potencial  $\zeta$  menos positivos. Esta composición parece tener un balance monómero neutro anfifílico/monómero cargado suficiente para complejar ADN y formar *polyplexes* y a la vez adecuado para la estabilización de entidades de menor tamaño debido a la menor repulsión electrostática (hay una menor densidad de carga) y a la mayor presencia de HPMA. La incorporación de unidades de HPMA puede apantallar interacciones iónicas extra además de contribuir, debido a su carácter anfifílico, a la estabilización coloidal de los *polyplexes* permitiendo en definitiva la formación de partículas de menor tamaño que las otras composiciones. En la **figura 3.4** se muestra esquemáticamente la información microestructural a nivel de triadas más pobladas de acuerdo al análisis llevado a cabo en el **Capítulo 2**. Se puede observar que la densidad de carga es muy alta en los sistemas EPA<sub>90</sub> y EPA<sub>70</sub> y muy baja en los EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub> (en estos últimos es tan baja que no pueden complejar ADN). EPA<sub>50</sub> tiene una densidad de carga intermedia y una presencia significativa de unidades de HPMA a lo largo de la cadena.

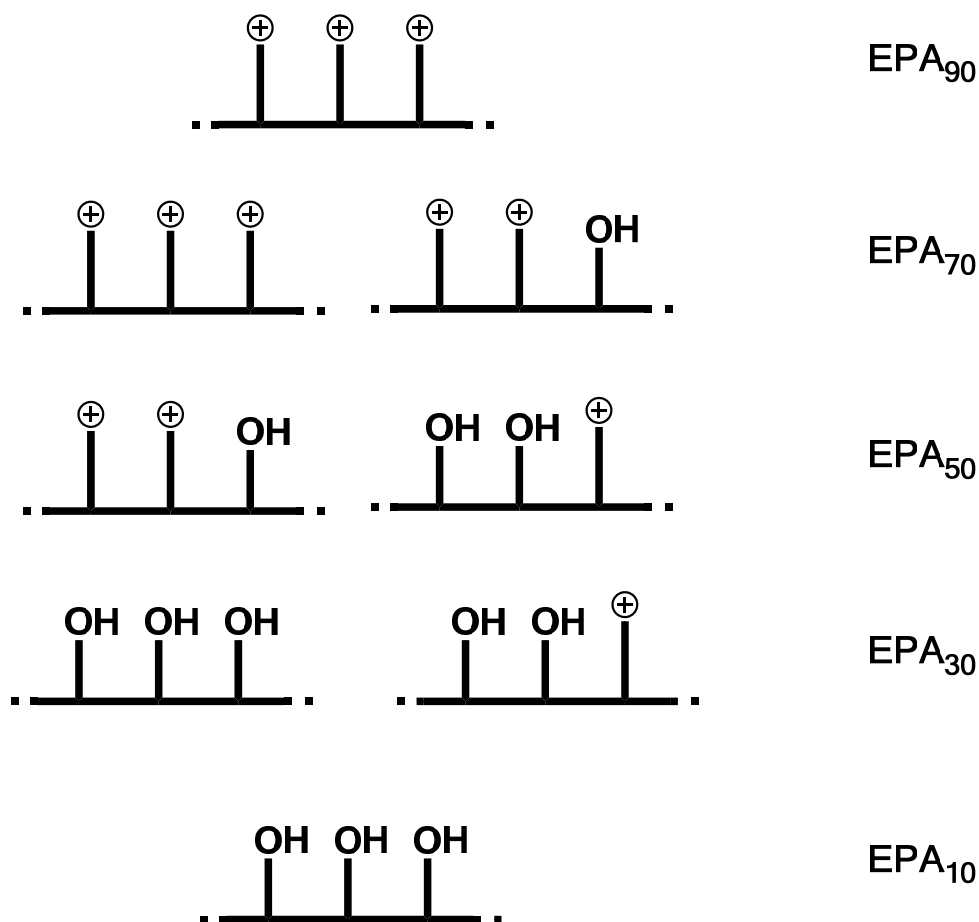
### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



**Figura 3.3.** Copolímeros poli(EPA-co-HPMA) a) Tamaño medio de partícula de los *polyplexes* formados a diferentes relaciones polímero/ADN, en PBS (pH 7,4). b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) de los *polyplexes* en PBS (pH 7,4). c) Eficiencia de transfección de los *polyplexes*, a diferentes relaciones polímero/ADN (p/p), en comparación con los controles positivos PLL y EPA<sub>100</sub>, en fibroblastos Swiss 3T3. La transfección fue realizada en ausencia de suero durante 4 horas, incubando posteriormente las células durante 48 h en medio de cultivo completo. Los valores de los controles positivos representados corresponden con los mejores resultados, obtenidos a las relaciones 15/1 en el caso de la PLL, y 10/1 en el caso del EPA<sub>100</sub>. En esta figura no se han representado los resultados obtenidos con los polímeros EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub>, debido a su incapacidad de complejar ADN. Los resultados obtenidos con las células tratadas con ADN desnudo fueron idénticos a los de las células control.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Las mediciones llevadas a cabo a pH 5, cuyos resultados no se muestran en la presente tesis doctoral, mostraron que los polímeros son capaces de formar complejos estables con ADN, mostrando una carga en superficie cercana a +40 mV, y unos tamaños de partícula en el rango cercano a 200 nm. Este es un dato relevante, ya que demuestra que estos complejos permanecen estables en las condiciones existentes el interior del lisosoma, y una vez liberados de éste, el polímero permanece complejo al plásmido, protegiéndolo de las nucleasas y otros factores hostiles presentes en el medio intracelular.



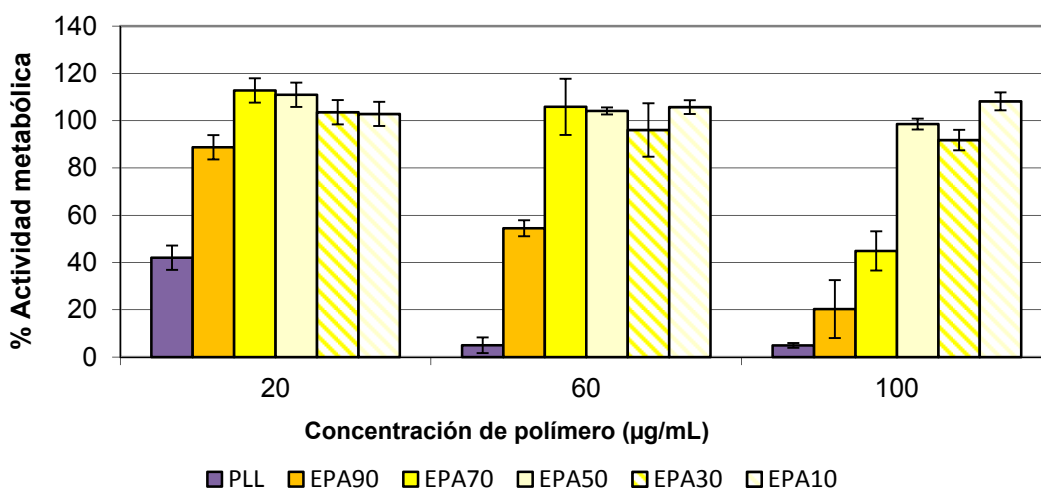
**Figura 3.4.** Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Triadas más pobladas (de acuerdo a la **tabla 2.3** del **Capítulo 2**).

El copolímero EPA<sub>50</sub> presenta además una excelente citocompatibilidad, mejor que la de los copolímeros EPA<sub>70</sub> y EPA<sub>90</sub> y comparable a la de EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub>, tal y como se muestra en la **figura 3.5**, donde se representa el estudio de actividad metabólica llevado a cabo con el reactivo comercial Alamar Blue. Los resultados muestran la actividad metabólica, que indica de una forma indirecta la viabilidad celular relativa de los fibroblastos Swiss 3T3 frente a los polímeros libres disueltos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo. Esta figura muestra que, como era de esperar y confirmando las hipótesis iniciales, la citotoxicidad es dependiente de la composición molar de los copolímeros y de la propia concentración de los polímeros. Cuanto mayor es la incorporación de HPMA mayor es la actividad metabólica, siendo similar a la de los controles positivos a partir del EPA<sub>50</sub>. Es decir, EPA<sub>50</sub>, EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub>

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

no son citotóxicos ni siquiera a altas concentraciones de polímero mientras que EPA<sub>70</sub> y EPA<sub>90</sub> muestran un comportamiento dependiente de la concentración, siendo EPA<sub>90</sub> el sistema más tóxico aunque menos que el control negativo PLL.

Esta citocompatibilidad de los sistemas EPA<sub>50</sub>, EPA<sub>30</sub> y EPA<sub>10</sub> es un resultado de gran interés pues demuestra que una incorporación del 50% de HPMA (o mayor) apantalla lo suficiente las cargas positivas como para reducir su citotoxicidad a cero. Recordemos que EPA<sub>10</sub> y EPA<sub>30</sub> no eran capaces de complejar ADN pero que EPA<sub>50</sub> sí. Es decir, EPA<sub>50</sub> presenta un balance único de componentes (ver **figura 3.4**), de unidades cargadas capaces de interaccionar con el ADN y de unidades neutras citocompatibles de HPMA, capaz a la vez de complejar ADN y de reducir la citotoxicidad a cero. Es además, o tal vez a consecuencia de ello, el sistema con una significativamente mayor capacidad de transfección.

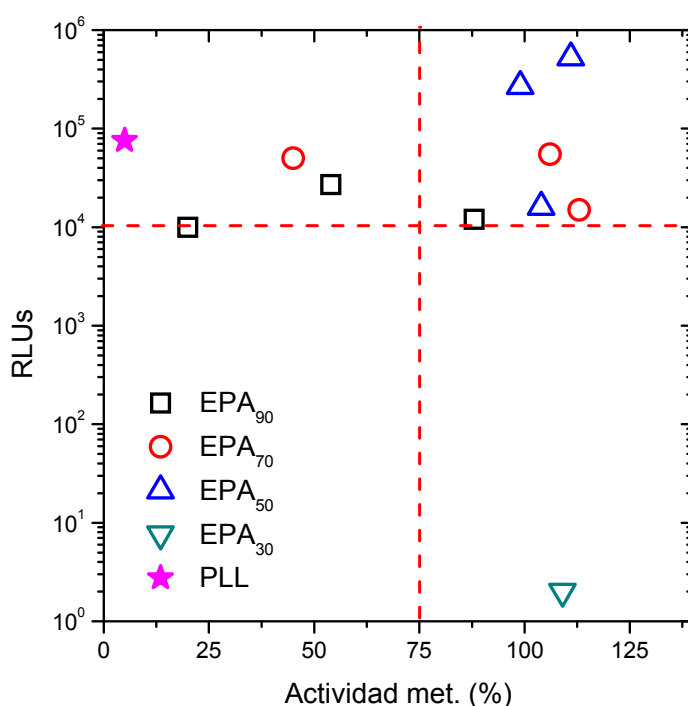


**Figura 3.5.** Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Porcentajes de actividad metabólica (ensayo con Alamar Blue) de los fibroblastos Swiss 3T3 tras 4 horas de incubación en presencia de los copolímeros poli(EPA-co-HPMA) y del control positivo PLL. Los datos fueron tomados tras 48 horas de incubación en medio completo y normalizados respecto a la actividad metabólica obtenida por las células sin tratar.

En la **figura 3.5** se ha representado la eficiencia de transfección de cada polímero frente a su actividad metabólica a cada concentración con el fin de evaluar conjuntamente los datos. Para ello se han aproximado las concentraciones de polímero a sus valores análogos en los *polyplexes*. Las concentraciones estudiadas en este ensayo de viabilidad celular, de 20, 60 y 100 µg/mL se corresponden con las cantidades de polímero presente en los *polyplexes* con relaciones polímero/ADN 2/1, 6/1 y 10/1. Esta aproximación debe de tomarse de forma orientativa, ya que la toxicidad que presentan estos polímeros catiónicos en su forma libre en disolución es siempre superior a la mostrada por éstos cuando se encuentran en forma de complejo polielectrolítico con el ADN; debido, entre otras razones, a la neutralización parcial de las cargas positivas de éstos durante el proceso de complejación. Debido a esto, los valores reales de viabilidad celular serían superiores a los mostrados en la **figura 3.5**.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

En la **figura 3.6** se observa que, tal y como se ha descrito antes, EPA<sub>50</sub> es un sistema claramente superior al resto, con un balance transfección/citotoxicidad excelente. Resulta también destacable que el copolímero EPA<sub>90</sub> presenta muy bajos niveles de transfección en todas las proporciones estudiadas, presentando los mayores niveles en las relaciones intermedias 6/1 y 8/1. A relaciones más altas la transfección es casi nula, probablemente debido a su alta toxicidad. Sin embargo, se observa que incluso a bajas relaciones polímero/ADN, donde se observa una baja toxicidad de este sistema, el polímero es incapaz de transfectar. En el caso del copolímero EPA<sub>70</sub>, observamos también bajos niveles de transfección, aunque en este caso los valores más altos aparecen en las relaciones más altas, 15/1 ó 20/1, superando a los valores obtenidos por los controles positivos PLL y EPA<sub>100</sub>. Este es un hecho bastante destacable ya que estas relaciones para EPA<sub>70</sub> son las más tóxicas de acuerdo a la **figura 3.6**. Este resultado podría ser explicado, no obstante, debido a la inestabilidad que presentan las estructuras celulares, principalmente las membranas plasmática y nuclear durante el proceso de muerte celular, lo que podría facilitar la entrada de estos complejos en la célula, y la expresión de nuestro gen marcador, la luciferasa, durante este período de tiempo previo a la muerte celular<sup>23</sup>.



**Figura 3.6.** Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Representación de la eficiencia de transfección de los 3 copolímeros capaces de complejar ADN (EPA<sub>90</sub>, EPA<sub>70</sub> y EPA<sub>50</sub>) frente a su actividad metabólica, usando las relaciones polímero/ADN 2/1, 6/1 y 10/1.

En definitiva, el sistema EPA<sub>50</sub> es el mejor sistema de esta familia, el más efectivo en transfección superando en casi un orden de magnitud a los controles. Parece que en esta composición el balance entre la unidad neutra anfifílica HPMA y la cargada EPA en el copolímero estadístico es adecuado para una buena complejación y estabilización del *polyplex*

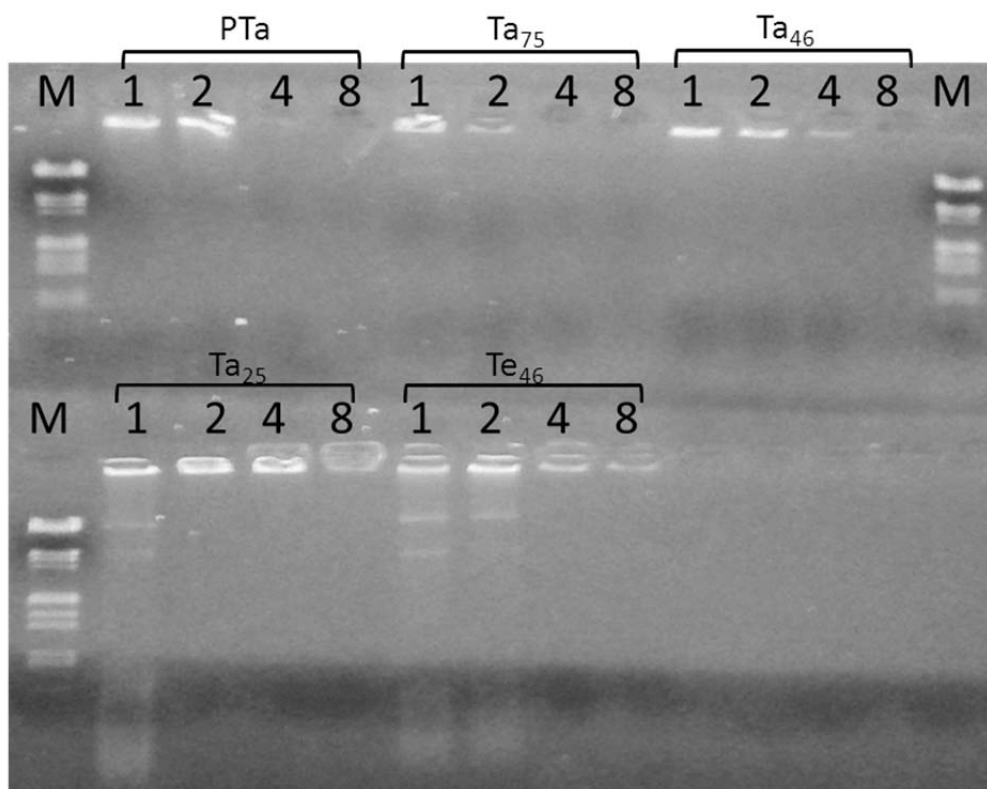


### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

(formando *polyplexes* con tamaños en torno a los 100 nm), y para una adecuada citocompatibilidad. Hay que remarcar que este balance se produce en un copolímero estadístico en el que ambas unidades están distribuidas estadísticamente a lo largo de las cadenas. Este tipo de disposición estructural (**figura 3.4**) de ambas unidades es bien distinto de los copolímeros de bloque o de injerto que son los más descritos en la literatura. Este balance de ambos componentes en la cadena en EPA<sub>50</sub>, y el efecto apantallante del HPMA, puede estar además relacionado con una disociación facilitada del complejo en el citoplasma (una vez internalizado en la célula), permitiendo la llegada del plásmido al núcleo celular y la expresión de las proteínas codificadas por éste<sup>24-28</sup>. Este hecho podría explicar parcialmente la alta eficiencia de transfección de este sistema comparado con los otros.

#### 3.3.1.2. Polímeros derivados de Ta y HPMA, y de Te y HPMA

La formación de los complejos polielectrolíticos con estos copolímeros a diferentes relaciones molares N/P fue examinada mediante electroforesis en gel de agarosa (**figura 3.7**) así como mediante DLS (los análisis de tamaño de partícula y potencial  $\zeta$  se muestran en la **figura 3.8.a** y **3.8.b**).



**Figura 3.7.** Movilidad electroforética del ADN plasmídico en los complejos polímero/ADN a diferentes relaciones N/P.

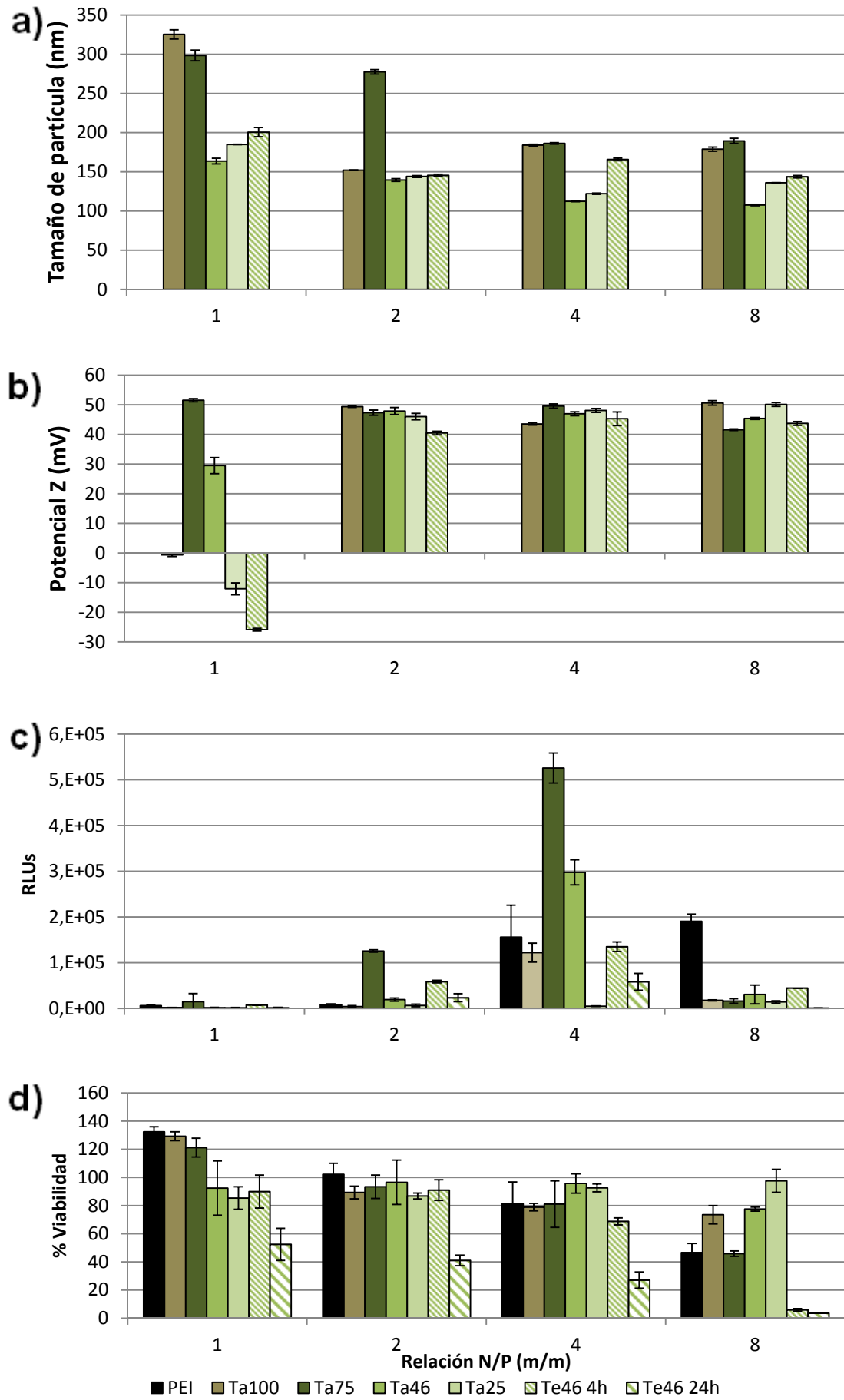
### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

En el ensayo de electroforesis, el ADN libre, no complejado, es capaz de migrar libremente hacia el polo positivo<sup>18-19</sup>. En la **figura 3.7** se puede observar como el ADN es complejado por los polímeros en todas las relaciones N/P estudiadas, excepto en la relación N/P más baja (1/1) del copolímero con la mayor proporción de HPMA, Ta<sub>25</sub> y en el caso del copolímero degradable Te<sub>46</sub>. Este comportamiento está de acuerdo con el estudio de DLS (**figura 3.8b**) en el que se observa, para esta relación 1/1, una dependencia de los valores de potencial  $\zeta$  con la composición, siendo este potencial para Te<sub>46</sub> y Ta<sub>25</sub> negativos y para Ta<sub>46</sub> positivo pero menor que para Ta<sub>75</sub>. En el caso de Ta<sub>25</sub>, parece que su baja densidad de carga y el posible efecto apantallante del componente mayoritario HPMA dificulta la interacción electrostática y la complejación eficiente del ADN. En el caso de sistema degradable Te<sub>46</sub>, la complejación no se da de forma completa en las relaciones 1/1 y 2/1, lo cual puede ser debido a una disminución de las cargas efectivas en el polímero por degradación parcial del  $\beta$ -aminoéster. Estos copolímeros a estas relaciones N/P pueden no ser tan efectivos en la carga de ADN como los otros. En cualquier caso, sí parece haber complejación parcial ya que los valores de potencial son superiores a los mostrados por el plásmido desnudo (cerca de -70 mV).

Por otra parte, es destacable que el valor de potencial del homopolímero Ta<sub>100</sub> a la relación 1/1 (N/P) es muy cercano a cero mientras que los de Ta<sub>75</sub> y Ta<sub>50</sub> son claramente positivos, lo cual puede ser debido al posible efecto del HPMA anfifílico como estabilizador coloidal, efecto que hace que la cadena de estos copolímeros con HPMA tengan mayor preferencia por situarse en la superficie que Ta<sub>100</sub>. Ya que la relación N/P 1/1 se refiere a una relación estequiométrica de carga y siendo las curvas usadas en las mediciones del potencial  $\zeta$  monomodales, esta diferencia en los valores de potencial parecen indicar que en el caso de Ta<sub>100</sub> el ADN está más expuesto al medio para esta relación 1/1. Para relaciones N/P mayores de 1/1 los *polyplexes* presentan valores de potencial positivos y muy similares, por encima de +20 mV (valores que indican que los *polyplexes* son estables en disolución).

**Figura 3.8.** Polímeros dendrónicos. a) Tamaño de partícula de los *polyplexes* formados a diferentes relaciones molares N/P en agua destilada. b) Valores de potencial  $\zeta$  de los *polyplexes* a diferentes relaciones N/P en agua destilada. c) Eficiencia de transfección de los polímeros estudiados, a diferentes relaciones molares N/P, en comparación con PEI, tras 48 horas, en fibroblastos Swiss 3T3. d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, determinada mediante un ensayo con calceína, 48 horas tras la transfección con los polímeros estudiados, en comparación con el control positivo PEI. La determinación de la viabilidad celular fue realizada mediante un ensayo con calceína, normalizando todos los resultados respecto a los de las células no tratadas. Los resultados obtenidos con las células tratadas con ADN desnudo fueron idénticos a los de las células control, por este motivo estos valores no han sido representados en las gráficas.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



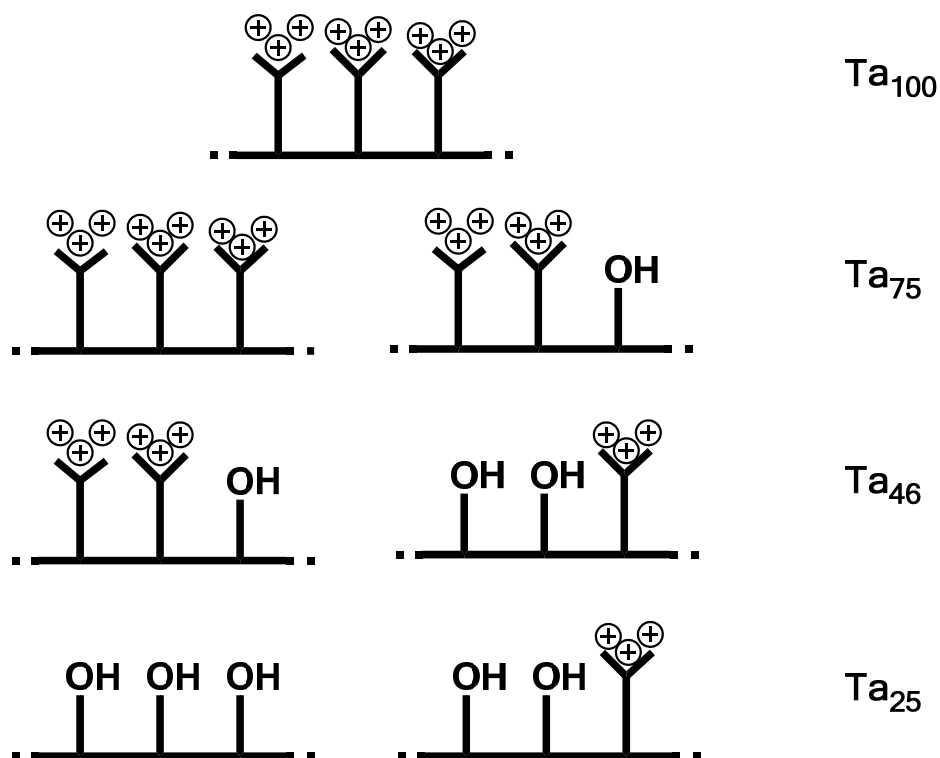
### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

En la **figura 3.8a** por otra parte se han representado los tamaños de partícula de los complejos polielectrolíticos, que mostraron unos tamaños en el rango entre 100 y 300 nm, mostrando cierta tendencia a tener un tamaño menor al incrementar la relación N/P. También resulta destacable que los sistemas con menores proporciones de HPMA muestran tamaños de partícula mayores, lo cual está de acuerdo con lo observado en el sistema anterior y puede atribuirse a la capacidad de estabilización coloidal del HPMA. Hay que señalar que es un análisis de tendencias, pues hay casos concretos que no se ajustan al mismo como es el del complejo Ta<sub>75</sub> en la relación 2/1 que presenta un tamaño anormalmente mayor que su serie. Las mediciones realizadas en medio ácido (pH 5), mostraron complejos estables con ADN, con carga neta en superficie cercana a +40 mV, y unos tamaños de partícula similares a los obtenidos en medio neutro. Estos resultados, no mostrados en este trabajo, demuestran no sólo que los *polyplexes* son estables en el interior del lisosoma, sino que además, la presencia de sales en el medio no influye de forma significativa en el tamaño de partícula ni en el valor de su carga en superficie.

En la **figura 3.9** se muestra de forma esquemática la distribución de cargas a lo largo de la cadena polimérica en función de los datos mostrados en la **tabla 2.4** del **Capítulo 2** de este trabajo. La estructura dendrítica de Ta hace que la distribución de cargas sea muy particular y muy diferente a la del sistema EPA-HPMA. En este caso por ejemplo no es posible tener cargas aisladas rodeadas por unidades de HPMA. Se puede observar que el homopolímero Ta<sub>100</sub> y el copolímero Ta<sub>75</sub> presentan una densidad de carga muy alta. El copolímero Ta<sub>25</sub> presenta una densidad local de cargas (asociada a la naturaleza dendrítica) alta pero una densidad global a lo largo de la cadena es muy baja, incapaz de complejar eficientemente ADN en la relación 1/1 como se ha mencionado anteriormente. El copolímero Ta<sub>46</sub> presenta una densidad global intermedia.

La eficiencia de transfección (**figura 3.8c**) de los polímeros estudiados fue determinada utilizando fibroblastos Swiss 3T3 de ratón. Los *polyplexes* fueron formulados a diferentes relaciones molares N/P, desde el valor 1/1 hasta 8/1, e incubados con las células durante 4 horas (en el caso del copolímero degradable también durante 24 horas) en medio de cultivo sin suero, con el objetivo de evitar interacciones inespecíficas de éstos con las proteínas del suero. Las células no tratadas, y células tratadas con ADN desnudo fueron usadas como control negativo, mientras que como control positivo de transfección se utilizaron *polyplexes* formulados con PEI hiperramificada de 25 kDa.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



**Figura 3.9.** Copolímeros poli(Ta-co-HPMA). Triadas más pobladas (de acuerdo a la **tabla 2.4** del **Capítulo 2**).

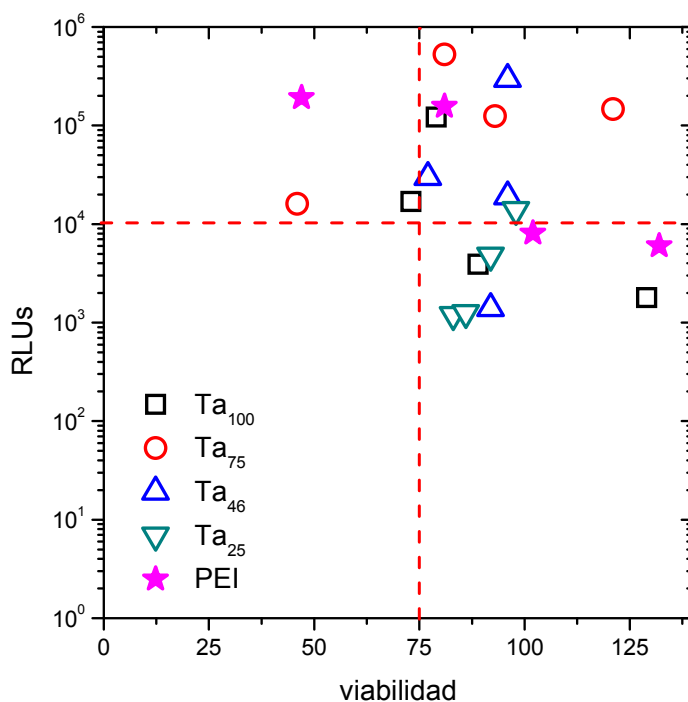
La mayor actividad de la luciferasa fue obtenida en la relación molar 4/1 (N/P) para todos los sistemas. Para esta relación, el homopolímero Ta<sub>100</sub> mostró niveles de transfección similares a los obtenidos con PEI, mientras que los copolímeros Ta<sub>75</sub> y Ta<sub>46</sub>, mostraron niveles de transfección notablemente mayores. Es destacable que el copolímero con mayor proporción de Ta, Ta<sub>75</sub>, muestra la mayor eficiencia de transfección; el copolímero intermedio, Ta<sub>46</sub>, mostró también altos niveles de transfección. Sin embargo, el copolímero con menor proporción de Ta, Ta<sub>25</sub>, ha mostrado los menores niveles de transfección, lo cual puede estar relacionado con la baja eficiencia de complejación antes mencionada. Por tanto, la incorporación de HPMA en relaciones adecuadas, que en este caso están dentro del rango de fracciones molares en alimentación de HPMA de 0,25 y 0,50, mejora la eficiencia de transfección como ocurría en el caso del sistema EPA-HPMA.

La viabilidad celular en presencia de estos polímeros, fue evaluada tras 48 horas de incubación, mediante un ensayo con calceína. Como se ha mencionado antes, la calceína puede proporcionar una medida de la viabilidad celular más exacta que el reactivo comercial Alamar Blue. En la **figura 3.8d** se representa el porcentaje de viabilidad de los polímeros estudiados. Los datos fueron normalizados respecto a las células no tratadas (100% de viabilidad). Los polímeros sintetizados de la serie Ta-HPMA, así como la PEI, no muestran una toxicidad significativa (viabilidad celular cercana o superior al 80%) tras la transfección con bajas relaciones N/P (4/1 o inferiores). Sin embargo, en la relación 8/1, la viabilidad se ve sensiblemente reducida excepto para el copolímero rico en HPMA Ta<sub>25</sub>, lo cual está de acuerdo

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

con el efecto citocompatibilizante de HPMA que ya se observó para el sistema EPA-HPMA. En cualquier caso, se puede observar que los tres copolímeros poli(Ta-co-HPMA) mostraron niveles de citocompatibilidad muy similares a la relación N/P 4/1 en la que ofrecen los mayores niveles de transfección. Es decir, en la relación 4/1, se puede concluir que las diferencias en los niveles de transfección entre ellos no pueden ser atribuidas a que existan diferencias en el número de células vivas capaces de expresar la luciferasa en cada muestra.

Respecto al copolímero degradable  $Te_{46}$ , sus niveles de transfección fueron cercanos a los del control positivo PEI cuando se incubó con las células durante 4 horas. En estas condiciones mostró unos niveles de toxicidad moderados, muy similares a los de su copolímero homólogo  $Ta_{46}$  excepto para altas relaciones N/P. Sin embargo, cuando la incubación en presencia de los *polyplexes* se prolongó durante 24 horas los niveles de viabilidad celular y consecuentemente de transfección se redujeron sensiblemente. Este hecho debe de relacionarse con el proceso degradativo asociado a la hidrólisis del  $\beta$ -aminoéster y a la mayor toxicidad de la amina dendrítica en forma libre comparada con la toxicidad de la amina unida a la macromolécula y rodeada de unidades de HPMA. Recordemos que en **Capítulo 2** se describía que a pH 7 este éster activado tenía una vida media de unos días (ver **figura 2.25**) y que tras 24 horas de incubación en medio acuoso ha sufrido una degradación significativa, liberando un 20% de amina al medio de cultivo, influyendo en la respuesta celular. En definitiva el carácter degradable del copolímero  $Te_{46}$  hace que este sistema no sea un vector apropiado.



**Figura 3.10.** Polímeros dendrónicos. Representación la eficiencia de transfección de los diferentes polímeros frente a su viabilidad en fibroblastos Swiss 3T3 a las diferentes relaciones N/P estudiadas.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

A modo de conclusión del análisis de este sistema, en la **figura 3.10** se representa la eficiencia de transfección de cada polímero respecto a su viabilidad, pudiéndose observar cómo a pesar de la alta citocompatibilidad mostrada por estos sistemas, existiendo una gran densidad de puntos cercanos a un 100% de viabilidad y los niveles de transfección son bajos en la mayoría de los casos. Existe sin embargo, un cierto rango de composición Ta-HPMA (entre los sistemas Ta<sub>46</sub> y Ta<sub>75</sub>) en la que el balance global para ciertas relaciones N/P es muy positivo en términos de citocompatibilidad y eficiencia de transfección. Se observa de nuevo que una apropiada incorporación de HPMA hace al sistema superior.

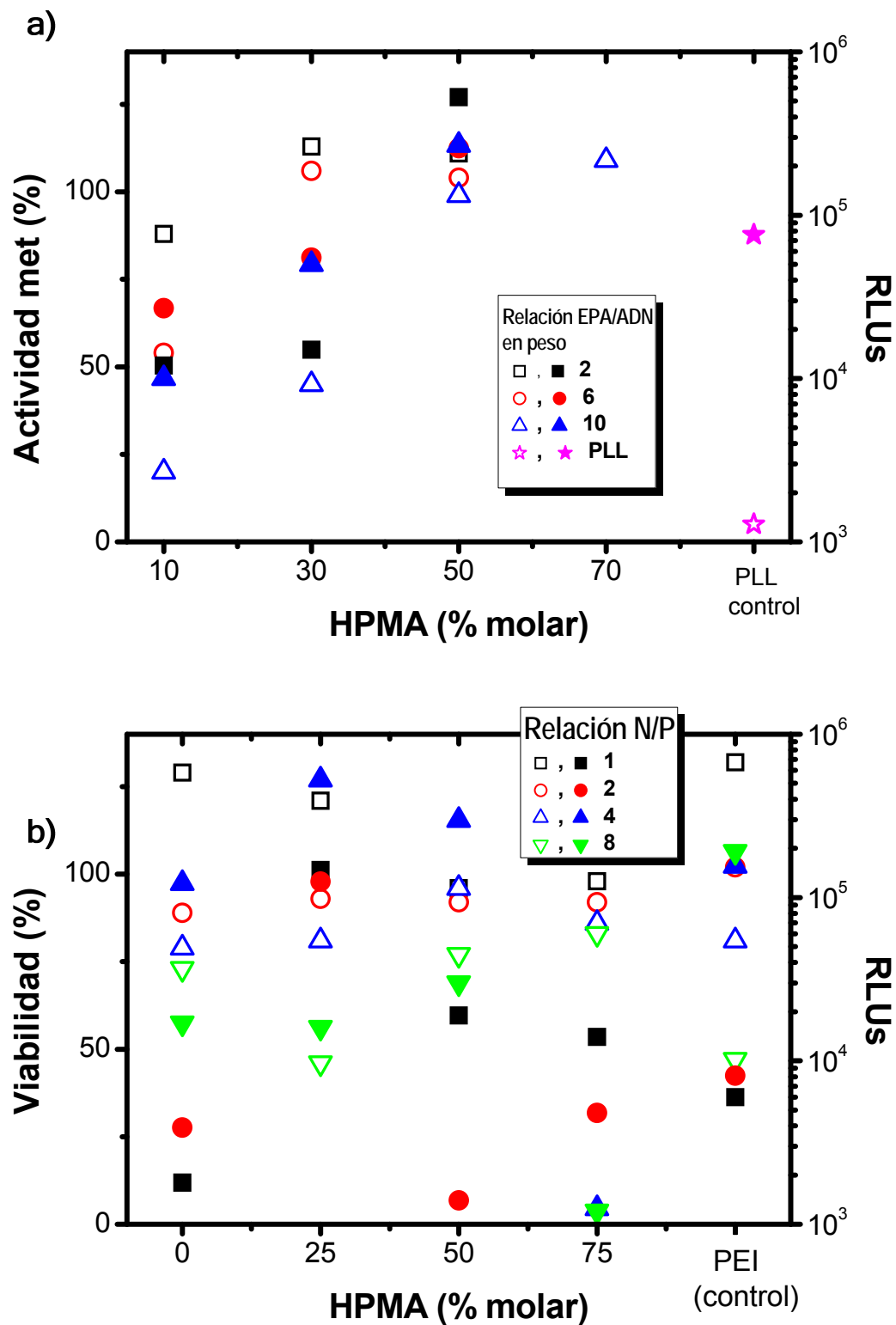
#### 3.3.1.3. Análisis conjunto de los sistemas EPA-HPMA y Ta-HPMA

Como se ha mencionado anteriormente, las significativas diferencias entre los dos protocolos usados para el estudio de cada uno de los dos sistemas, hace imposible una comparación directa entre ambos. Sin embargo, se han obtenido conclusiones comunes que invitan a hacer un análisis final conjunto. Para ello, en la **figura 3.11** se han representado, para los dos sistemas por separado, los datos de transfección y viabilidad antes discutidos en función de la fracción molar nominal de HPMA. En este apartado no se ha incluido el sistema degradable que ha mostrado ser poco apropiado para esta aplicación.

A la vista de los resultados obtenidos con estos copolímeros, la primera conclusión que se puede obtener es que se ha demostrado que la presencia del monómero HPMA aumenta la citocompatibilidad de los copolímeros de los que forma parte (marcadores huecos en la **figura 3.11**). A partir de fracciones molares de aproximadamente el 50% los sistemas no son citotóxicos ni siquiera a altas relaciones N/P, y se comportan como los controles citocompatibles. Este efecto citocompatible se puede atribuir a la disminución de la densidad de carga en la cadena así como a la menor accesibilidad de dichas cargas al incorporarse HPMA, características que reducen la interacción directa entre las cargas positivas del polímero y los dominios aniónicos de la membrana celular que son responsables de la citotoxicidad de estos sistemas<sup>29</sup>.

En segundo lugar, para los dos sistemas existe un balance composicional (en el caso del EPA-HPMA se da en el sistema EPA<sub>50</sub>, mientras que en el Ta-HPMA se da entre Ta<sub>46</sub> y Ta<sub>75</sub>) para el que hay una mejora sustancial de la eficiencia de transfección comparado con los homopolímeros catiónicos o los controles poliaminados como PLL o PEI (marcadores rellenos en la **figura 3.11**). Incorporaciones de HPMA más altas que estas dificultan la complejación y no son apropiadas. Esta mejora en la eficiencia de transfección puede estar relacionada con varios factores, como la mayor citocompatibilidad de estos sistemas, lo que permite que una alta proporción de células se mantengan vivas para expresar la luciferasa codificada por el plásmido utilizado. Además, los polímeros con menor proporción de monómero catiónico presentan una menor densidad de carga positiva, facilitando la liberación del ADN del complejo polielectrolítico una vez que éste ha entrado en la célula<sup>30-34</sup>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



**Figura 3.11.** Representación de la eficiencia de transfección (marcadores rellenos) y actividad metabólica o viabilidad celular (marcadores vacíos) frente a la proporción molar de HPMA de los sistemas: a) poli(EPA-co-HPMA) b) poli(Ta-co-HPMA).



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Por tanto, parece que existe un efecto sinérgico cuando se combinan estadísticamente y en las relaciones molares apropiadas (cercanas al balance equimolar) unidades cationizables capaces de complejar ADN y unidades neutras citocompatibles y estabilizantes de HPMA. Esto ha sido especialmente así para el sistema EPA<sub>50</sub>, que ha mostrado ser un sistema muy superior a cualquiera de los controles, con muy baja citotoxicidad y una eficiencia de transfección casi un orden de magnitud superior a los controles. El sistema Ta-HPMA ha mostrado ciertas diferencias, y no ha sido tan abrumadoramente superior a los controles. Un aspecto diferenciador interesante es el hecho de que la mayor eficiencia de transfección se ha conseguido con el sistema Ta<sub>75</sub>, seguido del Ta<sub>46</sub>, que poseen (sobre todo el Ta<sub>75</sub>) una densidad de aminos superior al EPA<sub>50</sub> debido a la naturaleza dendrítica de Ta. Recordemos que la carga molar de aminos de Ta<sub>46</sub> y Ta<sub>75</sub> era análoga a la de EPA<sub>70</sub> y EPA<sub>90</sub> respectivamente. Los resultados también sugieren que los derivados de Ta no tienen una citotoxicidad intrínseca asociada a las cargas positivas tan alta como la de los controles o el propio poli-EPA. Estas diferencias podrían estar de acuerdo con un menor número de cargas positivas 'efectivas' o 'accesibles' presentes en los polímeros dendrónicos respecto a sus sistemas EPA-HPMA 'homólogos'.

Para finalizar este análisis, recordemos que la mayoría de ejemplos descritos en la literatura reciente que combinan estos dos tipos de estructuras, describen combinaciones de polímeros preformados de los dos sistemas y no copolímeros estadísticos. Este trabajo sugiere que la combinación de unidades complementarias a lo largo de la cadena, y no en forma de copolímeros de bloque o de injerto, puede ser una aproximación ventajosa.

#### 3.3.2. Copolímeros glucosídicos

Debido al gran número de polímeros glucosídicos sintetizados, y con el objetivo de poder realizar una comparación cuantitativa de los resultados obtenidos con estos polímeros se tuvieron en cuenta una serie de factores a la hora de diseñar los ensayos de transfección y citocompatibilidad. En primer lugar, hay que tener en cuenta que la eficiencia de transfección de nuestros sistemas ha sido determinada de una forma indirecta a partir de las Unidades Relativas de Luminiscencia (RLUs) proporcionadas por el lector de placas. Estas unidades, como su propio nombre indica, son relativas, es decir, el valor numérico obtenido no hace referencia a una concentración de luciferasa en la muestra, por lo que es necesario llevar a cabo el estudio de transfección y viabilidad celular completo en un único experimento y en idénticas condiciones, utilizando todos los polímeros a estudiar, así como los controles positivos, en nuestro caso PEI y EPA<sub>100</sub>. También es necesario tener en cada placa de cultivo controles negativos, células sin tratar y células tratadas con ADN desnudo. Además, con este planteamiento se minimiza además la influencia de factores inherentes a la evolución del cultivo celular y su envejecimiento. Para poder asegurar, además, la reproducibilidad de los resultados, este experimento fue realizado varias veces, mostrando todos los polímeros

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

similares comportamientos. En este trabajo se muestra, de forma representativa, los resultados obtenidos en una de estas repeticiones.

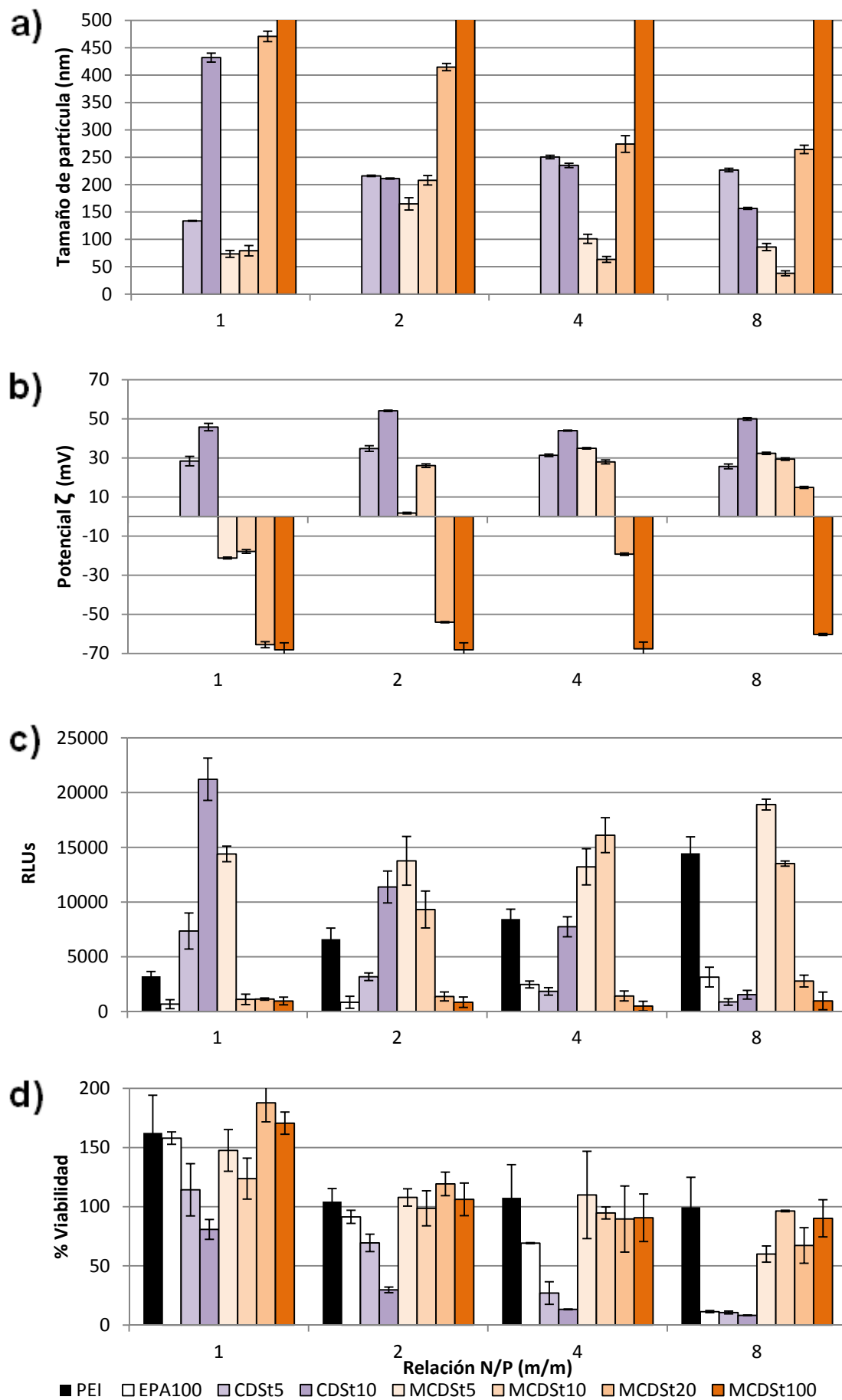
Además, este estudio se ha realizado de forma simultánea con dos líneas celulares, los fibroblastos Swiss 3T3 y células epiteliales de origen tumoral B16, ambas de ratón, con el objetivo de estudiar de una forma comparativa la capacidad de transfección y citocompatibilidad de los copolímeros de estudio en células control, en nuestro caso los fibroblastos, y en las células tumorales B16. El experimento con ambas líneas celulares fue realizado en idénticas condiciones. Además, para poder asegurarnos de la fiabilidad de una comparación entre ambas líneas celulares, un ensayo de actividad metabólica fue llevado a cabo con Alamar Blue (cuyos resultados no se muestran en este trabajo), donde se pudo comprobar que la actividad metabólica en ambas líneas celulares, era muy similar tras el tiempo de incubación correspondiente a este ensayo, lo que nos permite asegurar la comparabilidad de los resultados de ambas líneas.

#### 3.3.2.1 Copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt)

En las **figuras 3.12a y 3.12b** se muestran los tamaños de partícula, así como la carga en superficie de los *polyplexes* formados con los polímeros derivados de ciclodextrina a las diferentes relaciones N/P estudiadas. El homopolímero de referencia MCDSt<sub>100</sub>, que no posee unidades cationizables, no es capaz de complejar ADN y se mantiene soluble en el medio por lo que el estudio de *polyplexes* por DLS muestra para todas las relaciones solo entidades similares a las de ADN desnudo, de tamaños cercanos a 500 nm y potenciales  $\zeta$  muy negativos cercanos a -70 mV. El copolímero con un 20% molar de CD permetilada muestra un comportamiento similar a bajas relaciones N/P (entidades típicas de ADN desnudo, tamaños de nuevo de 500 nm y potenciales de -70 mV), es decir, en estas condiciones MCDSt<sub>20</sub> tampoco es capaz de complejar ADN.

**Figura 3.12.** Copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt) a) Tamaño medio de partícula de los complejos polímero/ADN, en agua destilada. b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) de los complejos utilizando agua destilada como disolvente. c) Eficiencia de transfección de los diferentes complejos polímero/ADN a diferentes relaciones molares N/P, en comparación con los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub>, en fibroblastos Swiss 3T3. d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección en comparación con los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

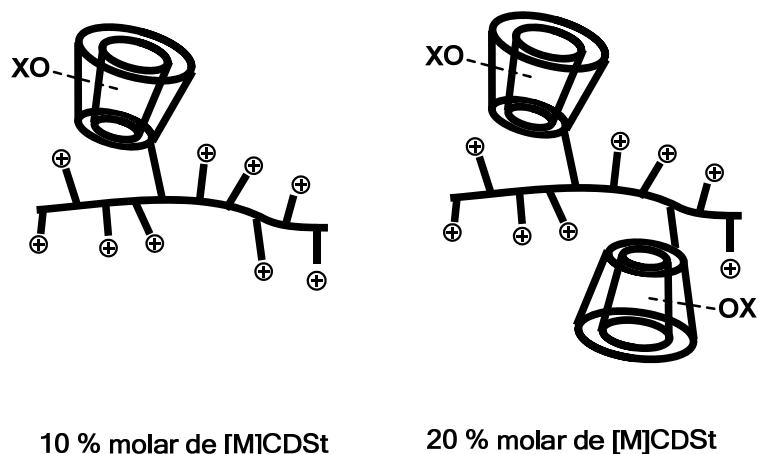
La razón de este comportamiento debe de estar asociada a los impedimentos estéricos de la CD debido a su gran volumen<sup>35</sup>, tal y como se muestra en la **figura 3.13** (parte derecha). Aunque un 20% molar no es un contenido alto en moles, sí lo es en volumen o en peso ya que esta unidad es aproximadamente 9 veces más grande que el EPA y como se observa en la **figura 3.13** las cargas tiene un gran apantallamiento estérico que dificulta la posible interacción con el ADN. Al aumentar la relación N/P a 4/1 o 8/1, cuando el sistema tiene un gran exceso de cargas positivas, los polímeros pueden compensar dicho apantallamiento y el porcentaje de cargas capaces de interactuar con el ADN es ya suficiente para formar complejos, observándose en las **figuras 3.12a y 3.12b** como MCDSt<sub>20</sub> en las relaciones 4/1 y 8/1 da lugar a entidades con potenciales  $\zeta$  cercanos a cero y tamaños de unos 250 nm.

Los sistemas con un 10%, y especialmente aquellos con un 5% molar de CDSt, no sufren este apantallamiento estérico de forma tan acusada (ver esquema de la **figura 3.13**) y pueden interactuar con el ADN en todas las relaciones como lo indican los datos de tamaños y potenciales de las **figuras 3.12a y 3.12b**, muy diferentes de los típicos de ADN desnudo. Se observan, sin embargo, importantes diferencias entre el uso de CD permetilada y no permetilada. Analizando en primer lugar las interacciones en la relación 1/1 se puede observar que los copolímeros con CD no permetilada dan lugar a entidades con superficies positivas y tamaños mayores que las entidades que se forman a partir de los copolímeros con CD permetilada, entidades que en este caso tienen superficies negativas. Estas diferencias en potenciales sugieren que los copolímeros portadores de CD no permetilada tienen una mayor interacción con el ADN que los sistemas con CD permetilada. Las CD no permetiladas son sistemas glucosídicos polihidroxilados, con menor solubilidad en agua que sus homólogos hidroxilados, debido a la existencia de enlaces de hidrógeno dentro del anillo oligosacárido, pudiendo tener esta mayor anfifilia un papel en la interacción del sistema con ADN. Además, como se ha visto en el estudio con el homopolímero MCDSt<sub>100</sub>, el monómero derivado de la forma permetilada de la  $\beta$ -CD es incapaz de complejar ADN incluso con altos excesos de polímero. El carácter negativo de las superficies en los derivados permetilados para esta relación 1/1, indica también que en estos sistemas parte del ADN es accesible al medio circundante.

Por otro lado, en las **figuras 3.12a y 3.12b** se observa que para la mayoría de las relaciones N/P los *polyplexes* que se forman con los derivados portadores de CD permetilada son de menor tamaño (entre 50 y 200 nm) que los que se forman con CD sin permetilar (entre 150 y 450 nm). Este hecho puede estar de acuerdo con el carácter anfifílico de la estructura permetilada y su capacidad estabilizante, la cual ha sido descrita en la literatura<sup>35</sup>, que permite la estabilización de partículas de un menor tamaño disminuyendo su tendencia a la agregación. Los sistemas portadores de CD no permetilada, más hidrofílicos, parecen tener un comportamiento más agregativo en concordancia con la formación de enlaces de hidrógeno y la baja solubilidad de la  $\beta$ -CD descrito en la literatura<sup>36</sup>. Recordemos también que los

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

copolímeros con estas CD no permetiladas han mostrado una solubilidad muy comprometida en medios polares o tampones acuosos y de hecho no han podido ser caracterizados por GPC.



**Figura 3.13.** Representación esquemática de secuencias con un 10 y un 20% molar de derivado de CD.

En la **figura 3.12c** se representan los resultados de transfección obtenidos con los sistemas derivados de CD, tanto en su forma hidroxilada como permetilada, utilizando los fibroblastos Swiss 3T3 de ratón como línea celular de estudio. Los sistemas que tenían dificultades para complejar ADN (o no eran capaces de ello), el homopolímero MCDSt<sub>100</sub> y el copolímero MCDSt<sub>20</sub>, obviamente muestran unos niveles de transfección muy bajos, similares a los que presenta el ADN desnudo. Este ADN desnudo es incapaz de llevar a cabo el proceso de transfección<sup>22</sup>, como se observó al medir la luminiscencia de las células tratadas con plásmido libre, que mostraron en todos los casos los mismos valores de luminiscencia que las células sin tratar. Debido a esto, no se han representado estos valores en ninguna de las gráficas de transfección de la presente tesis doctoral.

Los derivados con un 5 o 10 % molar de CD tienen un comportamiento muy dependiente de la permetilación, y muy relacionado a su vez con la citocompatibilidad de las estructuras permetiladas o no permetiladas. Los estudios de viabilidad celular se muestran en la **figura 3.12d**. Los derivados no permetilados CDSt<sub>5</sub> y CDSt<sub>10</sub> muestran un carácter citotóxico, mayor que el control EPA<sub>100</sub>, y creciente al aumentar la relación N/P. Este resultado indica que la unidad portadora de la CD nativa no permetilada contribuye de forma aditiva con la unidad cationizable a la citotoxicidad. Esto puede estar relacionado con la capacidad descrita en la literatura de estas CD para extraer elementos hidrofóbicos de membrana, desestabilizándola<sup>37</sup>. Esta citotoxicidad creciente al aumentar la relación N/P explica la variación de los datos de transfección de estos sistemas no permetilados, que es alta para la relación 1/1 y disminuye de forma creciente al aumentar dicha relación, siendo la transfección en la relación más alta 8/1 muy baja. En cualquier caso, es destacable la alta transfección de estos sistemas en la relación

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

1/1, especialmente la del CDSt<sub>10</sub>. Es destacable por otra parte que el mejor sistema de los no permetilados (CDSt<sub>10</sub> en la relación 1/1, muy superior al control PEI para esta relación y al propio EPA<sub>100</sub> que es muy poco eficiente) es el que formaba *polyplexes* positivos más grandes, de alrededor de 450 nm, cuando está descrito que la internalización está favorecida con tamaños menores de éstos<sup>2</sup>.

Los copolímeros con un 5 y un 10% de CD permetilada, MCDSt<sub>5</sub> y MCDSt<sub>10</sub>, tienen un comportamiento radicalmente diferente en citotoxicidad y son efectivos en transfección a cualquier relación N/P, con eficiencias mayores o del orden del control PEI (a excepción del MCDSt<sub>10</sub> a la relación 1/1 que tiene una eficiencia muy baja). En la **figura 3.12c** se puede observar que estos sistemas son muy citocompatibles, especialmente el MCDSt<sub>10</sub>, que incluso a la relación más alta de 8/1 tienen una viabilidad similar al control. El control EPA<sub>100</sub>, el polímero sin CD, tiene una citotoxicidad creciente con la relación N/P, siendo muy tóxico en la más alta 8/1. Todo ello indica que, al igual que ocurría con la unidad HPMA en los copolímeros descritos anteriormente, la unidad de CD permetilada confiere citocompatibilidad al sistema, y que un 10% molar del mismo hace al copolímero citocompatible en cualquier relación N/P (o al menos en las ensayadas aquí). Es de destacar que, a excepción del sistema MCDSt<sub>10</sub> en la relación 1/1, todos los *polyplexes* derivados de estos dos copolímeros, tienen una alta y constante eficiencia de transfección, claramente superior a la del control PEI para bajas relaciones y similar para la más alta 8/1. Los *polyplexes* derivados de estos copolímeros eran los que mostraban de promedio un menor tamaño, entre 50 y 100 nm.

Se puede hacer por tanto un análisis, en el caso de la CD permetilada, similar al que se hizo con HPMA en cuanto al balance de componentes. La inclusión de CD permetilada confiere citocompatibilidad al sistema, y un 10% molar (que corresponde a un 40 % en peso aproximadamente) hace al *polyplex* citocompatible en todo el rango de relaciones N/P. Sin embargo, el gran volumen de este sustituyente hace que un 20% ó más de carga estirénica dificulte la complejación con el ADN y haga al sistema inefectivo. Parece que el balance ideal es el que se da en el copolímero MCDSt<sub>10</sub>, con una alta y constante eficiencia de transfección y una nula citotoxicidad para todas las relaciones N/P. Es un sistema superior globalmente al control PEI a excepción de la relación 1/1 para la que este sistema no es efectivo, tal vez debido a la ligera carga negativa superficial de este *polyplex* en comparación con el resto. Algunos de los factores relacionados con la CD permetilada que podrían estar implicados en esta buena eficiencia podrían ser la mencionada capacidad de estabilización que protege el ADN y favorece la formación de *polyplexes* de pequeño tamaño, así como la liberación de ADN en el citoplasma.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### **Determinación de la eficiencia de transfección y viabilidad celular con los complejos derivados de los copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt) en células epiteliales de origen tumoral B16**

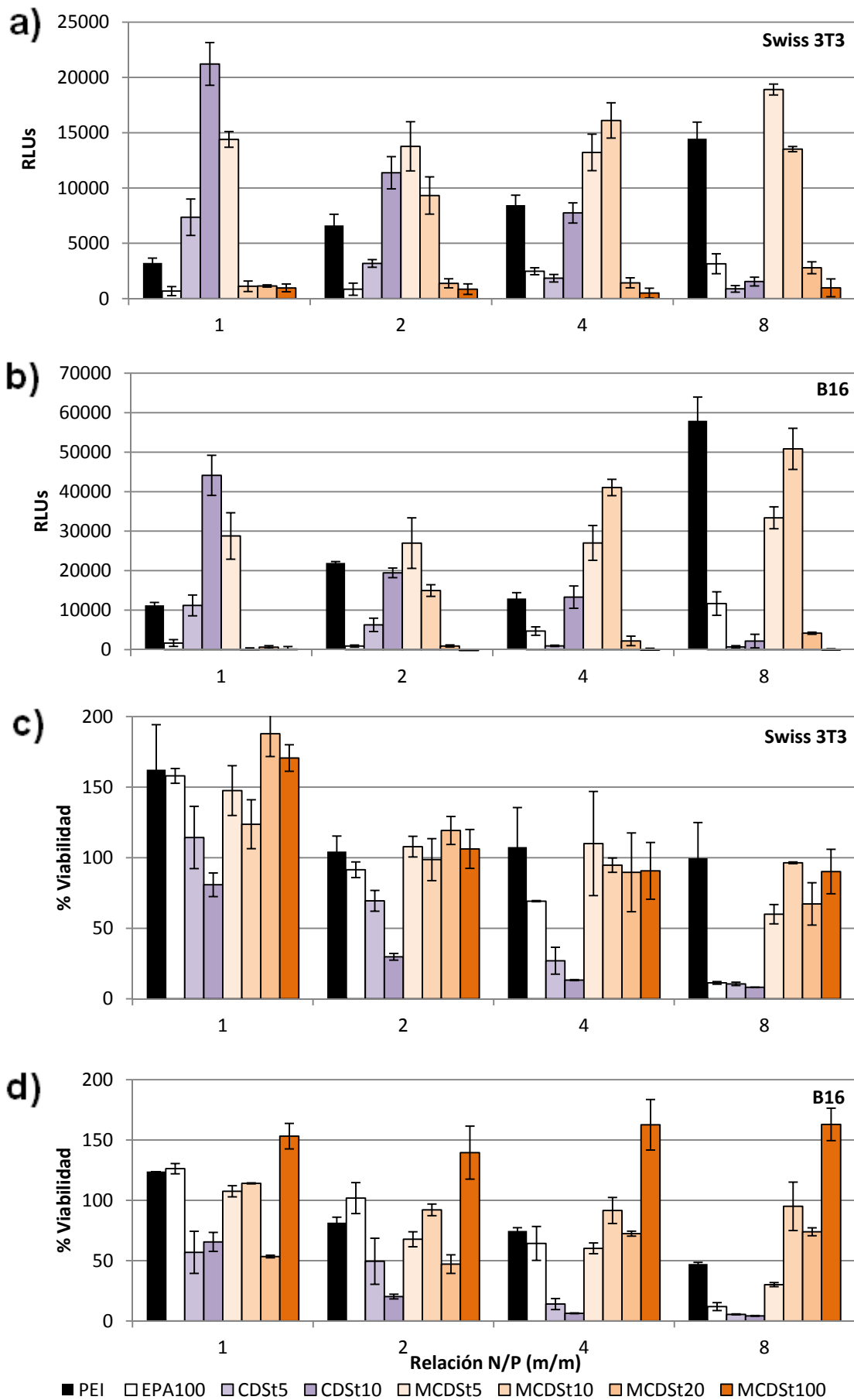
En la **figura 3.14** se muestran los resultados de los transfección y citocompatibilidad realizados con las células tumorales B16 de ratón. En esta figura se han incluido de nuevo los resultados obtenidos con fibroblastos Swiss 3T3 (**figuras 3.14a y 3.14c**) para facilitar el análisis comparativo. Los ensayos con ambos tipos de células fueron realizados en las mismas condiciones. Los resultados obtenidos con las dos líneas celulares son en general muy comparables, observándose de nuevo el efecto citotóxico de la CD no permetilada y el efecto citocompatible de la permetilada. En relación con este dato, de nuevo la eficiencia en transfección de los *polyplexes* derivados de la estructura no permetilada disminuyen al aumentar la relación N/P, siendo el valor a N/P de 1/1 superior al control de PEI. Los derivados con CD permetilada MCDSt<sub>20</sub> y MCDSt<sub>100</sub> no son eficientes probablemente por su baja o nula capacidad de complejar ADN, como ocurría antes. Los sistemas MCDSt<sub>5</sub> y MCDSt<sub>10</sub>, en cambio, si son eficientes y superiores o comparables al control para todas las relaciones, a excepción de nuevo del MCDSt<sub>10</sub> en la relación 1/1.

Hay sin embargo hechos distintivos en esta línea celular que pueden ser relevantes. En primer lugar hay que tener en cuenta que los niveles de transfección de todos los sistemas de estudio, así como los de los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub> muestran unos niveles de luminiscencia (RLUs) superiores al doble de los mostrados en células Swiss. En segundo lugar, se observa una citotoxicidad diferencial para ciertos sistemas como el control PEI, o los *polyplexes* derivados de MCDSt<sub>5</sub> y MCDSt<sub>20</sub>. Todos ellos son más tóxicos en las células tumorales. Esta citotoxicidad diferencial puede tener gran interés, como se comenta más adelante y será explorada en el futuro.

Además, ya que el sistema MCDSt<sub>10</sub> sigue siendo totalmente citocompatible y eficiente (excepto para la relación 1/1), la citotoxicidad mostrada por el control PEI refuerza el valor de los resultados obtenidos, pues apunta a que el balance de unidades en dicha estructura MCDSt<sub>10</sub> puede ser superior a una poliamina pura en un balance global con diferentes líneas celulares, ya que las poliaminas son intrínsecamente citotóxicas.

En cualquier caso, a pesar de que PEI es citotóxico con esta línea tumoral en la relación 8/1 (con una viabilidad del 50%), su eficiencia en esta relación es la más alta de la serie. Como se ha mencionado anteriormente, esta alta transfección podría estar relacionada con la inestabilidad que presentan las membranas plasmática y nuclear durante el proceso de muerte celular, inestabilidad que podría facilitar la entrada de estos complejos en la célula, y la replicación y transcripción del gen durante este período de tiempo previo a la muerte celular.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección





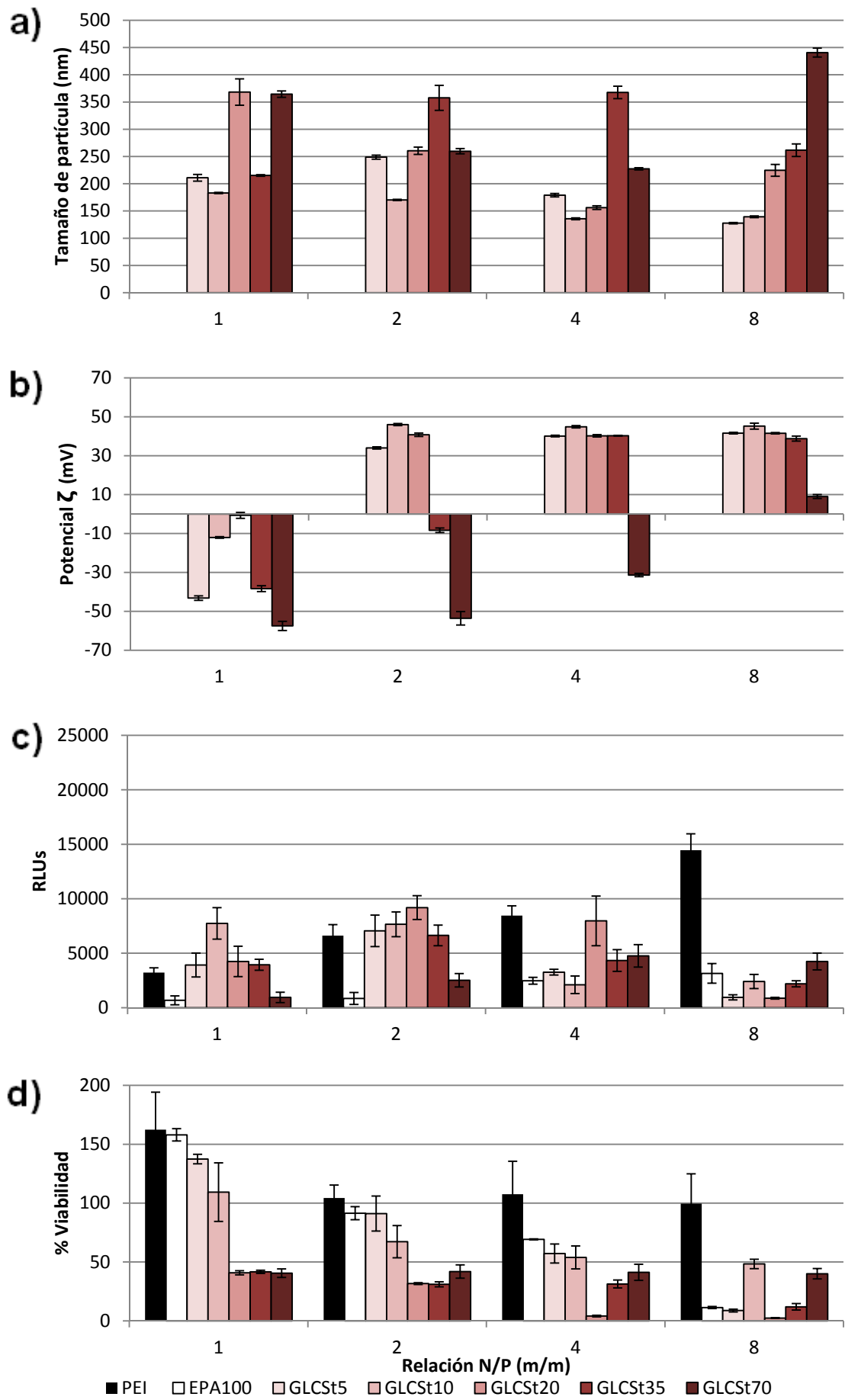
### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

**Figura 3.14.** Copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt) a) Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.12c**). b) Eficiencia de transfección de los *polyplexes* en células tumorales B16. c) Viabilidad celular de los *polyplexes* en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.12d**). d) Viabilidad celular de los *polyplexes* en Células tumorales B16.

#### 3.3.2.2 Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt)

En las **figuras 3.15a y 3.15b** se muestran los tamaños de partícula, así como la carga en superficie de los *polyplexes* formados con los polímeros derivados de  $\alpha$ -glucosa (monómero GLCSt) a las diferentes relaciones N/P estudiadas. Se puede observar que los copolímeros con una alta carga de unidad estirénica glucosídica tienen dificultades para complejar ADN. Así, el sistema GLCSt<sub>70</sub>, en las relaciones 1/1 y 1/2 muestra valores de potenciales de -50mV, cercanos a los típicos de ADN desnudo, y tamaños por encima de 200 nm. Estos valores indican que en estos copolímeros tan ricos en GLCSt, las unidades cationizables están altamente impedidas estéricamente e interaccionan con dificultad con el ADN (ver esquema de la **figura 3.16**). En el análisis de triadas del **Capítulo 2** para este tipo de copolímeros, se mostraba que GLCSt<sub>70</sub> poseía muy pocas triadas EEE, y una mayoría en orden creciente de EEU\*, EEU y UUU (**tabla 2.8**). En cualquier caso, el hecho de que las características sean cercanas pero no tan extremas como las típicas del ADN desnudo, muestran que existe una complejación parcial, a diferencia de algunos ejemplos del apartado anterior que eran totalmente incapaces de complejar. De nuevo, a mayor relación N/P mayor complejación (potenciales menos negativos), ya que el número relativo de cargas accesibles capaces de interaccionar con ADN aumenta correlativamente. El sistema derivado de GLCSt<sub>35</sub>, que posee ya una mayoría de grupos cationizables (ver **figura 3.16**), muestra un comportamiento menos extremo, con potenciales claramente positivos a altas relaciones N/P y siendo la relación 1/1 la única con valores de potencial muy negativos. Este sistema poseía como triadas más pobladas las EEE y EEU\*, seguidas por las UUE\* y EUE (**tabla 2.8**). El hecho de que aun existiendo un porcentaje medio de triadas EEE y EEU\* (fracciones molares de 0,30 y 0,27 respectivamente), este copolímero compleja mal en la relación 1/1 indica que la estructura lateral polihidroxilada GLCSt ejerce un significativo poder apantallante sobre las secuencias de dos o tres cargas de EPA.

3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



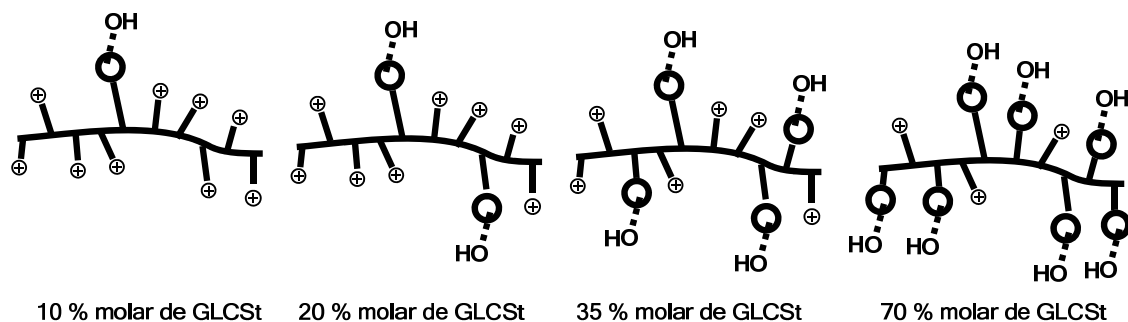
### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

**Figura 3.15.** Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) a) Tamaño medio de partícula de los complejos polímero/ADN, en agua destilada. b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) de los complejos formulados utilizando agua destilada como disolvente. c) Eficiencia de transfección de los diferentes complejos polímero/ADN derivados de  $\alpha$ -glucosa en comparación con los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub>, en fibroblastos Swiss 3T3. d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección con los polímeros derivados de la  $\alpha$ -glucosa, en comparación con los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub>.

El resto de los copolímeros forman *polyplexes* con superficies claramente positivas, indicativas de una complejación completa con ADN, a excepción de la relación 1/1 en la que los *polyplexes* son negativos o neutros. En esta relación 1/1, que es la estequiométrica de cargas, se observa un comportamiento bastante singular pues la carga superficial no es correlativa a la composición sino que al aumentar la carga de GLCSt desde 5 % molar a 70 % molar, pasa de negativa (-40 mV para el 5%) a neutra (20%) y de nuevo a negativa como se ha mencionado antes (-50mV para el 70%). Parece que largas secuencias de unidades cationizables de EPA (presentes en GLCSt<sub>5</sub>, con una mayoría abrumadora de triadas EEE) y los posibles efectos de repulsión electrostática y restricción asociada de configuraciones, tiene un efecto de apantallamiento similar al de las unidades de GLCSt en los copolímeros ricos en el mismo (GLCSt<sub>70</sub>). Se podría decir que el balance microestructural del copolímero GLCSt<sub>20</sub> (mayoría de triadas en orden creciente de EUE, EEU\* y EEE) permite el porcentaje relativo de cargas accesibles más alto. Este copolímero en la relación 1/1 da lugar a *polyplexes* mayores que los otros de esta serie (a excepción del más rico en GLCSt), lo cual podría estar explicado por esta cancelación completa de cargas y la incapacidad estabilizante de las estructuras de GLCSt. Esta incapacidad estabilizante está de acuerdo también con la tendencia de tamaños de los sistemas en la relación 8/1 donde hay exceso claro de carga positiva para todos los sistemas. En esta relación, cuanto mayor es la cantidad de GLCSt, mayor es el tamaño, lo que indica que GLCSt confiere al complejo propiedades agregantes antes que estabilizantes. Este comportamiento estará probablemente relacionado con la formación de enlaces de hidrógeno en estas estructuras polihidroxiladas.

En las **figuras 3.15c y 3.15d** se muestran los resultados de transfección y citocompatibilidad de los polímeros derivados de  $\alpha$ -glucosa en células Swiss 3T3. A excepción de la relación N/P más alta 8/1, en la que los sistemas son muy poco eficientes, se puede observar cómo los niveles de transfección de estos copolímeros son comparables a las del control de PEI y en general superiores al control EPA<sub>100</sub>. Al aumentar la relación N/P los sistemas muestran una tendencia global a ser menos eficientes, tendencia muy clara en la relación 8/1. Este hecho se puede relacionar con la citotoxicidad de los sistemas, al igual que ocurría con los derivados de CD no permitilada. Las unidades de GLCSt parecen conferir citotoxicidad a los sistemas. Fijándonos en la relación 1/1 se observa que cuanto mayor es la carga de GLC menor es la viabilidad celular. Igualmente cuanto mayor es la relación N/P menor es la viabilidad para todos los sistemas. En definitiva, estos resultados indican que la incorporación de GLC no es apropiada para esta aplicación.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



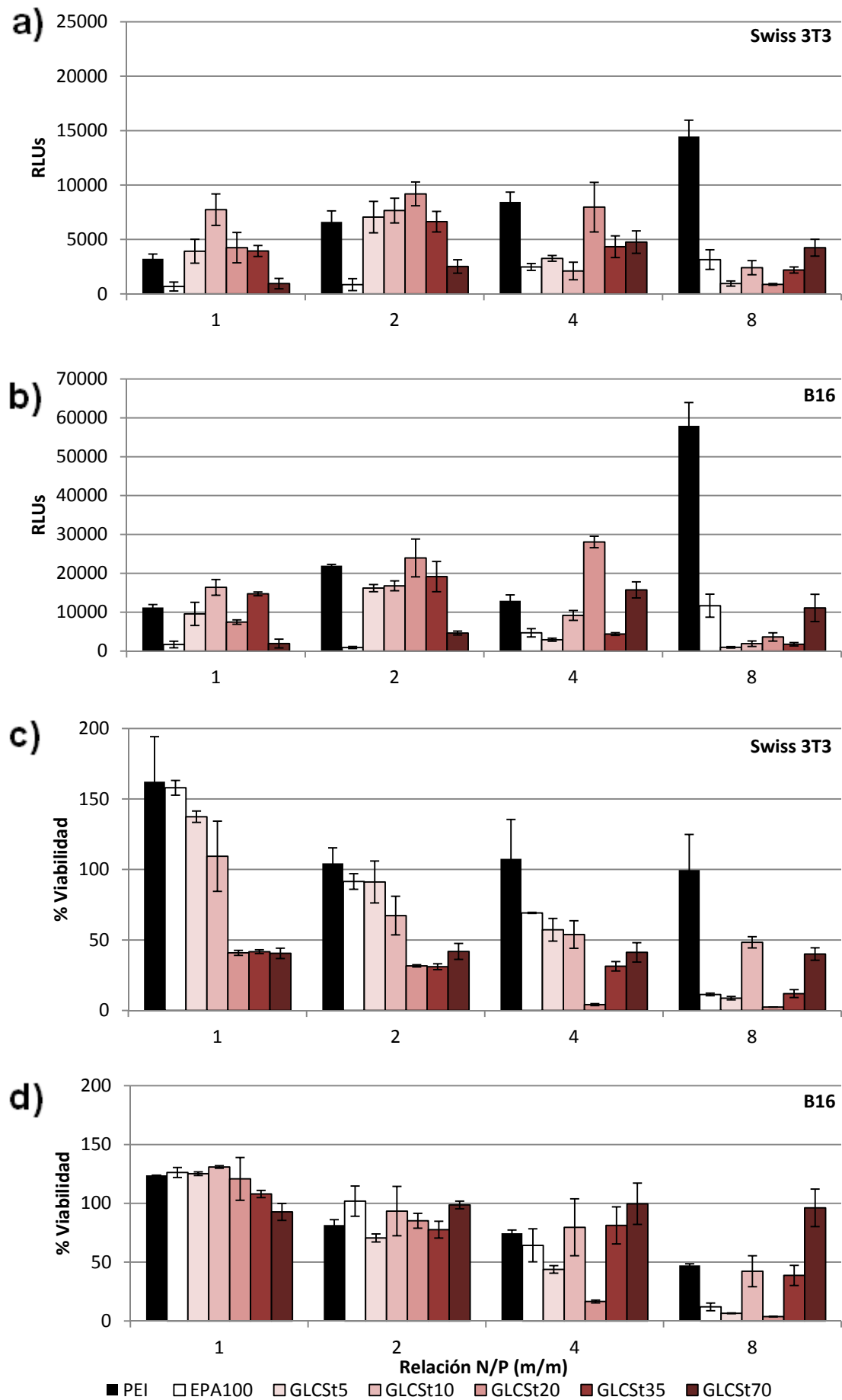
**Figura 3.16.** Representación esquemática de secuencias con un 10, 20, 35 y 70% molar de derivado de GLCSt.

#### **Determinación de la eficiencia de transfección y viabilidad celular con los complejos derivados de los copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) en células epiteliales de origen tumoral B16**

En la **figura 3.17b** se muestran los niveles de transfección de los copolímeros derivados de  $\alpha$ -glucosa en los células epiteliales de origen tumoral B16 de ratón. En esta figura se han incluido de nuevo los resultados obtenidos con fibroblastos Swiss 3T3 para facilitar el análisis comparativo (**figuras 3.17a** y **3.17c**). Como ocurría con los derivados de CD, los resultados de viabilidad, y especialmente los de transfección, son muy comparables para las dos líneas celulares. Por ello, los resultados de transfección no se van discutir de nuevo ya que lo dicho en el apartado anterior es aplicable a esta línea. Únicamente hay que señalar que, como en el caso de los derivados de CD, los valores de RLUs obtenidos con esta línea tumoral son cercanos al doble del valor obtenido por estos sistemas, incluidos los controles positivos, en células Swiss.

**Figura 3.17.** Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) a) Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.15c**). b) Eficiencia de transfección de los *polyplexes* en células tumorales B16. c) Viabilidad celular de los *polyplexes* en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.15d**). d) Viabilidad celular de los *polyplexes* en Células tumorales B16. Los experimentos fueron realizados en idénticas condiciones para ambas líneas celulares. Para todos los copolímeros se estudiaron todas las relaciones N/P formuladas. Los controles positivos de transfección utilizados fueron PEI y EPA<sub>100</sub>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

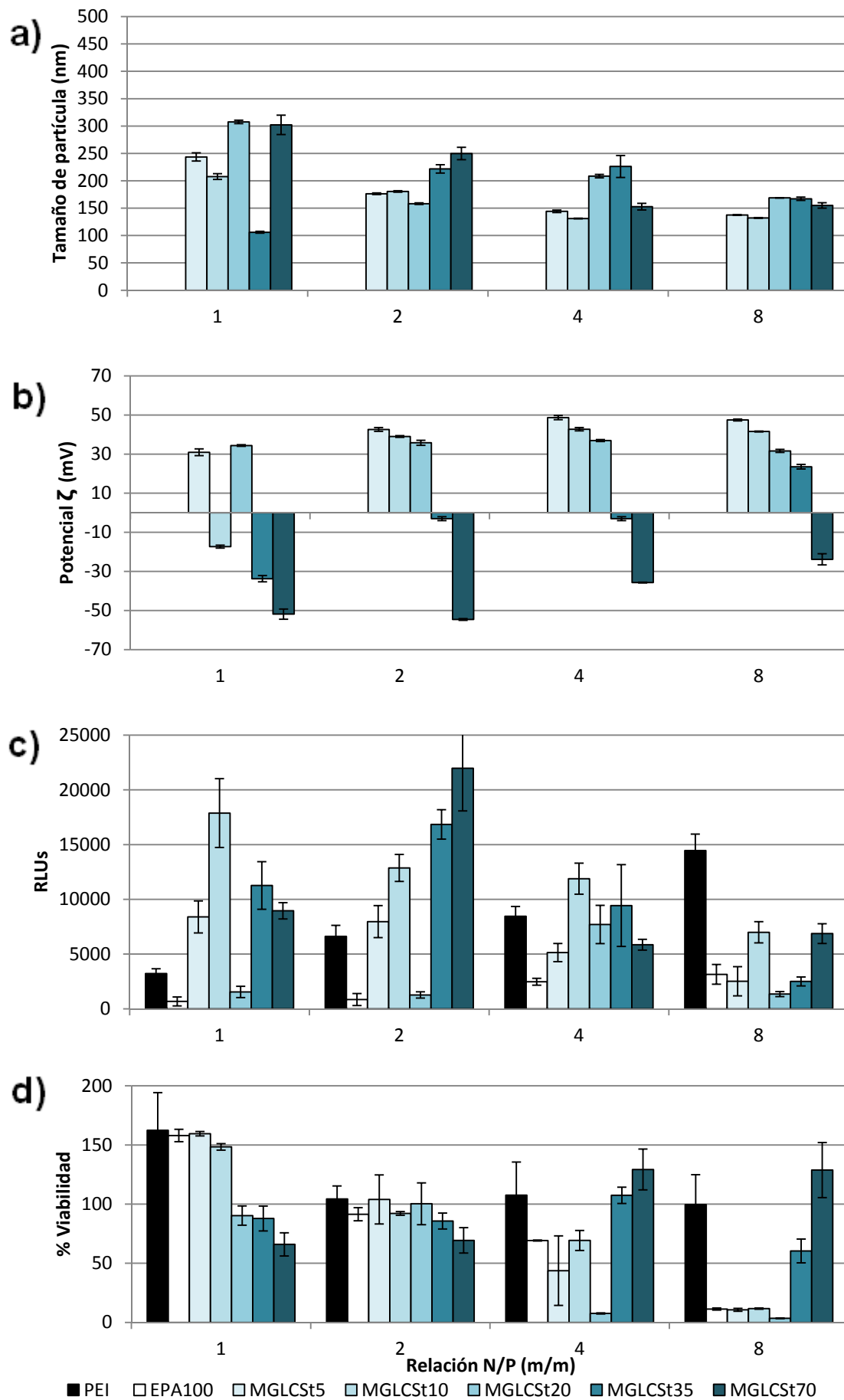
Respecto a la citocompatibilidad sobre esta línea celular tumoral (**figura 3.17d**), se puede observar una tendencia muy comparable a la obtenida con las Swiss, aunque en general los niveles de viabilidad en la línea celular tumoral son mayores, lo que parece indicar que esta línea celular tumoral tiene una mayor tolerancia hacia este tipo de copolímeros. Resulta destacable el sistema GLCSt<sub>70</sub>, donde la diferencia de viabilidad es más acusado, siendo mucho más compatible con las células tumorales que con los fibroblastos.

#### 3.3.2.3 Copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt)

En las **figuras 3.18a y 3.18b** se muestran los tamaños de partícula, así como la carga en superficie de los *polyplexes* formados con los polímeros derivados de la forma permetilada de  $\alpha$ -glucosa a las diferentes relaciones N/P estudiadas. De nuevo se observa que el copolímero más rico en MGLCSt (MGLCSt<sub>70</sub>) tiene dificultades para interaccionar y complejar ADN, ya que muestra potenciales  $\zeta$  negativos en todas las relaciones, siendo estos cercanos a -50 MV a las menores relaciones. Recordemos que en esta composición había muy pocas triadas EEE y muchas UUU y UUE\* (**tabla 2.8**). De todas formas, el hecho de que incluso a estas bajas relaciones no se alcancen los valores del ADN desnudo, así como los tamaños estudiados que son siempre inferiores a 300 nm, indican que en cualquier caso sí existe cierta interacción electrostática, la cual obviamente depende de la relación N/P. Cuanto mayor es esta relación N/P, mayor número de cargas accesibles y mayor interacción con el ADN, ya que el potencial  $\zeta$  es menos negativo y el tamaño es menor. En los *polyplexes* derivados de estos sistemas en cualquier caso una fracción significativa de ADN está expuesta al ambiente.

**Figura 3.18.** Copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt) a) Tamaño medio de partícula de los complejos polímero/ADN en agua destilada. b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) de los complejos formulados utilizando agua destilada como disolvente. c) Eficiencia de transfección de los diferentes complejos polímero/ADN derivados de la forma permetilada de  $\alpha$ -glucosa en comparación con los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub>, en fibroblastos Swiss 3T3. d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección con los polímeros derivados de la forma permetilada de  $\alpha$ -glucosa, en comparación con los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Comparando los resultados de potencial negativos en la relación 1/1 con los sistemas similares del sistema anterior basado en GLCSt, el hecho de que el copolímero con esta carga de glucosa sin permetilar (sistema anterior GLCSt<sub>70</sub>) formase *polyplexes* también con carga negativa pero muy superiores en tamaño apunta ya a la capacidad estabilizante de la forma permetilada MGLCSt, más anfifílica, en contraste con el mencionado carácter agregativo de la no permetilada. El siguiente copolímero en orden de carga de MGLCSt, MGLCSt<sub>35</sub>, muestra un comportamiento relacionado con el de MGLCSt<sub>70</sub> aunque su dificultad para interaccionar con ADN es mucho menos acentuada pues solo en la relación 1/1 muestra superficie negativa (y con valores de potencial  $\zeta$  -30 mV), mientras que en las relaciones intermedias tiene carga neutra y en la más alta de 8/1 es positiva. Esta composición tiene ya una mayoría de triadas EEEy EEU\* (**figura 3.19** y **tabla 2.8**). El resto de los copolímeros, a excepción del MGLCSt<sub>10</sub> en la relación 1/1 que forma *polyplexes* con un potencial  $\zeta$  de -20 mV, complejan bien con ADN y forman complejos con superficies claramente positivas con valores de potencial  $\zeta$  del orden de +30 mV. Todos ellos tienen una mayoría de triadas EEE, mayor cuanto menor es la cantidad de MGLCSt. Para casi todas las relaciones N/P, y teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, existe una dependencia clara entre el valor de potencial  $\zeta$  y la composición, siendo la superficie más positiva cuanto menos MGLCSt hay en el copolímero. En otras palabras, MGLCSt ejerce un efecto apantallante sobre las aminas cationizables.

En cuanto al tamaño, siendo todos en promedio del mismo orden y pequeños (100-300 nm), se observa una tendencia a disminuir con la relación N/P, lo cual de nuevo está de acuerdo con la capacidad estabilizante de la glucosa permetilada anfifílica.

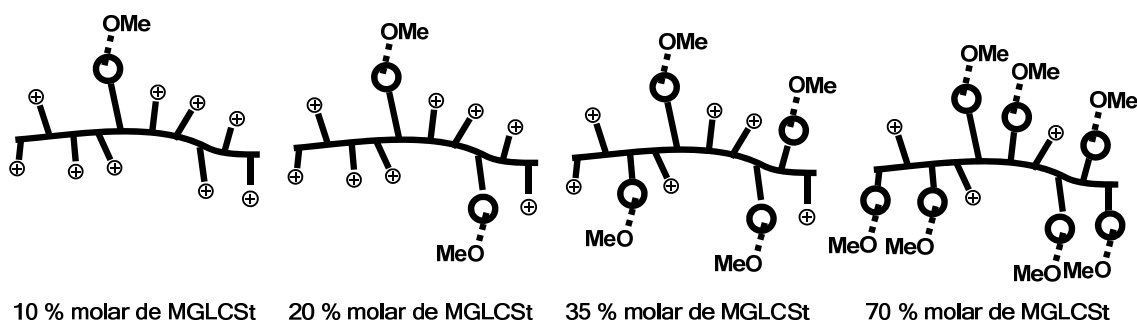
En las **figuras 3.18c y 3.18d** se muestran los resultados de los ensayos de transfección y citocompatibilidad de los sistemas derivados de la  $\alpha$ -glucosa permetilada. Destaca la alta eficiencia de transfección de los sistemas MGLCSt<sub>5</sub> y MGLCSt<sub>10</sub> a bajas relaciones N/P hasta llegar a la relación 4/1, superando los niveles del control positivo PEI en todos los casos. También son altamente sorprendentes los niveles de transfección obtenidos con los sistemas MGLCSt<sub>35</sub> y MGLCSt<sub>70</sub>, a bajas relaciones N/P llegando a superar los valores de la PEI, y en caso de la relación 2/1, superando incluso los niveles del copolímero MGLCSt<sub>10</sub>. Este hecho resulta llamativo, ya que como muestran las **figuras 3.18a y 3.18b**, estas partículas presentan una carga neta negativa en superficie, lo que hace que la interacción de éstos con la membrana plasmática (cargada negativamente) no sea debida a una simple interacción electrostática; es posible que exista algún mecanismo específico, como un receptor que reconozca específicamente al derivado permetilado de  $\alpha$ -glucosa, permitiendo su internalización en la célula. En relación con este posible mecanismo hay que señalar que los *polyplexes* derivados de MGLCSt<sub>10</sub> en la relación 1/1, que muestran una de las eficiencias en transfección más altas, presentaban también potenciales  $\zeta$  ligeramente negativos.

Los resultados en transfección deben analizarse conjuntamente con los de viabilidad, que han resultado ser complejos y de difícil correlación global con la composición. De forma



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

genérica, se observa que MGLCSt<sub>5</sub> y MGLCSt<sub>10</sub> presentan un comportamiento en viabilidad dependiente de la relación N/P y similar al control EPA, siendo citocompatibles a bajas relaciones N/P (en las que muestran mayores niveles de transfección) y tóxicos en las más altas. Siendo los copolímeros más parecidos a EPA<sub>100</sub> (tienen solo un 5 ó 10% de carga molar de MGLCSt y unas fracciones molares de triadas EEE de 0,86 y 0,73, (ver **figura 3.19** y **tabla 2.8**), tiene sentido que muestren un comportamiento en viabilidad similar, el cual es dependiente del exceso de carga y de la citotoxicidad intrínseca asociada a la misma en poliaminas como EPA<sub>100</sub>. Sin embargo, esta pequeña carga molar de MGLCSt es suficiente para incrementar enormemente la eficiencia de transfección a relaciones bajas de 1/1 y 1/2, superior al control EPA<sub>100</sub> en más de un orden de magnitud, y superior también al control PEI. Esta gran influencia en transfección mostrada por una pequeña incorporación molar de MGLCSt en las relaciones N/P no citotóxicas puede de nuevo estar relacionada con la existencia de algún mecanismo específico de interacción de MGLCSt con la membrana.



**Figura 3.19.** Representación esquemática de secuencias con un 10, 20, 35 y 70% molar de derivado de MGLCSt.

Los sistemas derivados de MGLCSt<sub>35</sub> y MGLCSt<sub>70</sub> presentan de promedio una buena citocompatibilidad en todas las relaciones, lo cual se puede explicar por la menor densidad de carga positiva (de hecho la superficie es casi siempre negativa o neutra en estos *polyplexes*, siendo las fracciones molares de triadas EEE minoritarias de 0,30 y 0,042). Sin embargo, si nos centramos en MGLCSt<sub>70</sub>, este sistema sorprendentemente parece ser citocompatible a altas relaciones N/P (4/1 y 8/1) y ligeramente citotóxicas a bajas relaciones (2/1 y 1/1) en las que los *polyplexes* eran claramente negativos. En cualquier caso los niveles de viabilidad son siempre superiores al 60-70%. Es destacable que a esas relaciones altas en que es más citocompatible es menos eficiente en transfección que a relaciones bajas.

Un análisis conjunto incluyendo el sistema MGLCSt<sub>20</sub>, que es muy citotóxico a altas relaciones 4/1 y 8/1 y que sorprendentemente presenta una eficiencia en transfección muy baja a bajas relaciones N/P, hace difícil extraer conclusiones generales acerca del papel de MGLCSt en la viabilidad. Aunque de forma genérica se observa que cuanto mayor es la cantidad de MGLCSt mayor es la viabilidad, parecen existir ciertas combinaciones de carga y

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

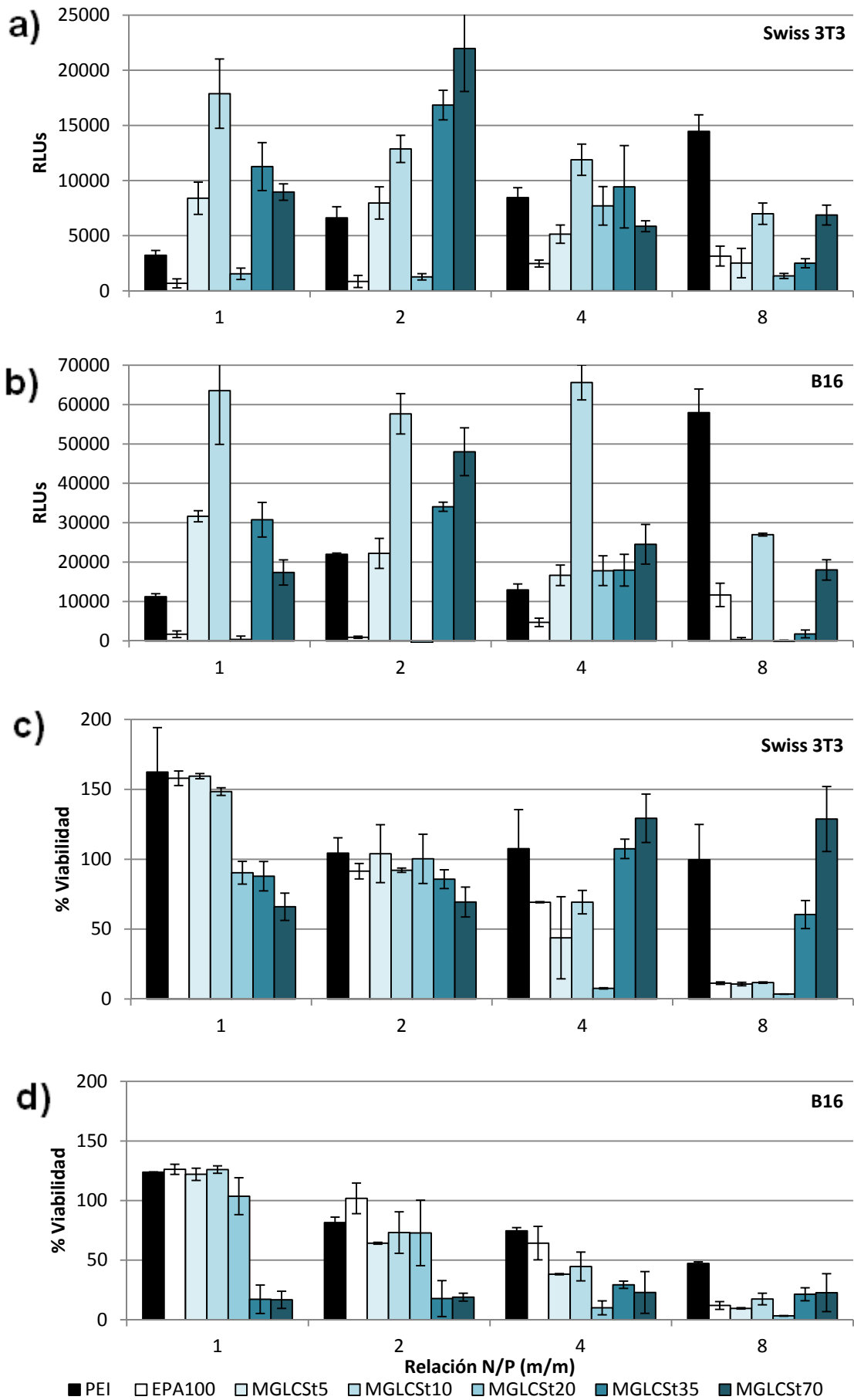
MGLCSt para las que hay un efecto sinérgico en la citotoxicidad, tal y como se observaba en el caso anterior EPA-GLCSt.

#### **Determinación de la eficiencia de transfección y viabilidad celular con los complejos derivados de los copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt) permitilada en células epiteliales de origen tumoral B16**

En la **figura 3.20** se muestran los niveles de transfección, así como la citocompatibilidad de los polímeros derivados de la  $\alpha$ -glucosa permitilada en células epiteliales de origen tumoral B16 de ratón. En esta figura se han incluido de nuevo los resultados obtenidos con fibroblastos Swiss 3T3 para facilitar el análisis comparativo (**figuras 3.20a y 3.20c**). De nuevo los resultados de eficiencia de transfección entre las dos líneas celulares son muy comparables. Destaca el sistema MGLCSt<sub>10</sub> que muestra la eficiencia más alta y constante en la línea tumoral en las relaciones 4/1 o inferiores. Hay que resaltar que los sistemas MGLCSt<sub>5</sub> y MGLCSt<sub>10</sub> muestran en promedio casi el cuádruple de RLUs que en células Swiss, mientras que los valores de los controles positivos PEI y EPA<sub>100</sub> sólo se han visto duplicados (a excepción de PEI en la relación 8/1, en que es además más citotóxico). También resulta destacable que los sistemas MGLCSt<sub>35</sub> y MGLCSt<sub>70</sub> no han incrementado tanto sus niveles de transfección, sobre todo a altas relaciones N/P, un dato que podría estar relacionado con su menor citocompatibilidad en esta línea celular. En realidad, los resultados de viabilidad son comparativamente muy diferentes entre las dos líneas celulares, especialmente para estos copolímeros MGLCSt<sub>35</sub> y MGLCSt<sub>70</sub>, que presentan una alta toxicidad en células tumorales, siendo altamente compatibles en las células control. Esta toxicidad selectiva hacia células tumorales, que ya se observó en los derivados de MCDSt, es muy interesante y será explorada con mayor profundidad en el futuro. De nuevo se observa una mayor sensibilidad de esta línea celular tumoral al control PEI.

**Figura 3.20.** Copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt) a) Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.18c**). b) Eficiencia de transfección de los *polyplexes* en células tumorales B16. c) Viabilidad celular de los *polyplexes* en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.18d**). d) Viabilidad celular de los *polyplexes* en Células tumorales B16. Los experimentos fueron realizados en idénticas condiciones para ambas líneas celulares. Para todos los copolímeros se estudiaron todas las relaciones N/P formuladas. Los controles positivos de transfección utilizados fueron PEI y EPA<sub>100</sub>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### 3.3.2.4. Análisis conjunto de los copolímeros glucosídicos. Influencia de la estructura en las propiedades.

Hay tres aspectos estructurales fundamentales de los copolímeros EPA-USt que influyen en las propiedades de los sistemas: a) La composición, es decir, la cantidad relativa de EPA, unidad cationizable, y de unidad estirénica sacarídica; b) La naturaleza monosacarídica u oligosacarídica de (M)GLC y (M)CD respectivamente, y las grandes diferencias en volumen entre ambas; y c) la permetilación (o la no permetilación en los polihidroxilados).

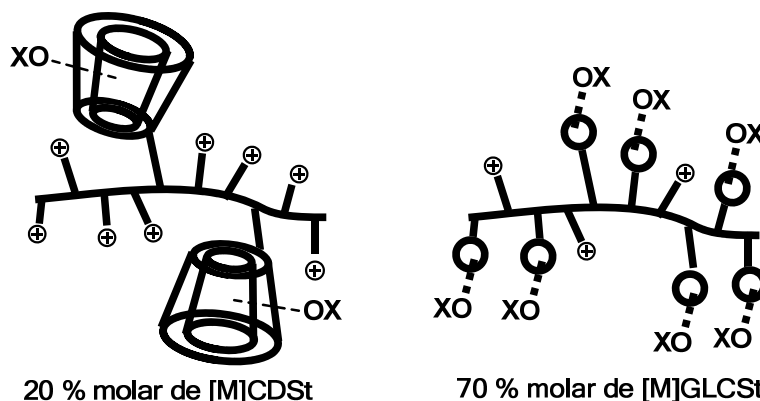
EL gran volumen de los derivados de CD hace que se hayan usado en porcentajes molares bajos, siendo las composiciones molares más representativas aquellas que incorporan un 5 y un 10% molar de CD. Para los derivados de glucosa en cambio se han preparado copolímeros en todo el rango de composiciones con el fin de poder hacer un análisis comparativo global. Para llevar a cabo un análisis de este tipo se ha hecho una conversión de la composición molar de unidades en porcentaje molar de anillos sacarídicos. En el caso de los derivados de glucosa, este % molar de anillos coincide con el porcentaje molar de unidad estirénica ya que son derivados monosacarídicos. En el caso de los derivados de  $\beta$ -CD, que son oligosacáridos de 7 anillos, las composiciones molares del 5 y 10% de CD se corresponden con un 27 y 44 % molar de anillo sacarídico. Usando como ejemplo el copolímero con un 5% molar de CD, en el que por cada 5 unidades portadoras de CD (y por tanto 35 anillos) hay 95 de EPA, el porcentaje molar de anillo sacarídico es  $(35 \cdot 100) / (35 + 95) = 27$ .

#### Influencia de la estructura copolimérica en la formación de complejos

En todos los casos la complejación de los copolímeros con ADN se ve dificultada en los sistemas con mayor porcentaje de comonómero glucosídico, aunque las diferencias asociadas al tamaño de (M)CDSt hace que en este sistema el porcentaje molar a partir del cual hay apantallamiento de cargas sea muy pequeño, del 20%, mientras que los sistemas derivados de glucosa necesitan un porcentaje molar muy elevado de la unidad estirénica para obtener un efecto de apantallamiento similar (del 70%). En la **figura 3.21** se muestran esquemáticamente las diferencias estructurales entre ambas familias.

Comparando las composiciones con un efecto de apantallamiento similar, (M)CDSt<sub>20</sub> y (M)GLCSt<sub>70</sub>, evidentemente poseen una distribución de cargas muy diferente, ya que con un 70% de (M)GLCSt la mayoría de las cargas están rodeadas por una unidad glucosídica (mayoría de triadas en orden creciente de UUE y UUU, **tabla 2.8**) mientras que el sistema con un 20% de (M)CDSt aún mantiene largas secuencias de EPA (fracción molar de triadas EEE de 0,52).

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

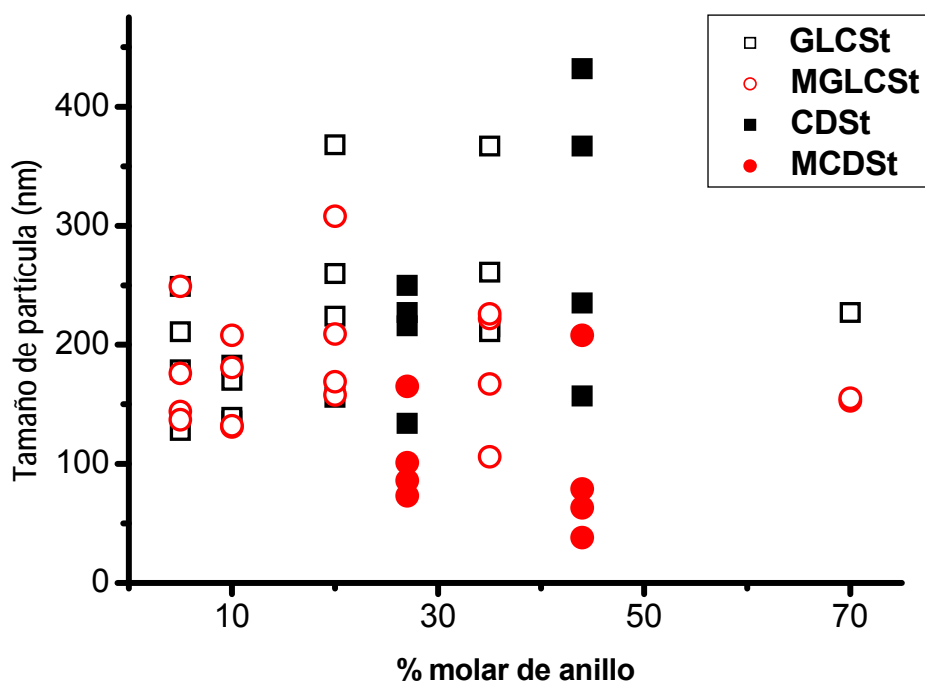


**Figura 3.21.** Representación esquemática de las diferencias estructurales de los polímeros derivados de (M)CDSt<sub>20</sub> y (M)GLCSt<sub>70</sub> y su posible influencia en su eficiencia el apantallamiento de las cargas positivas del monómero EPA, y por tanto, de su complejación con ADN.

A partir del análisis de cada uno de los sistemas se puede extraer que la permetilación tiene un papel muy relevante en la estabilización o agregación de los complejos. En la **figura 3.22** se han representado los tamaños de los diferentes *polyplexes* en función de la cantidad molar de anillos glucosídicos.

El tamaño promedio de los *polyplexes* obtenidos a partir de copolímeros portadores de estructuras permetiladas es claramente inferior al de los derivados glucosídicos no permetilados. Además, se observa una tendencia a una disminución o aumento de dicho tamaño al aumentar la composición de unidades glucosiladas permetilados o no permetiladas respectivamente. Por tanto los derivados polihidroxilados muestran un carácter agregativo, que se debe de relacionar con la facilidad de formación de enlaces de hidrógeno observado en compuestos como la  $\beta$ -CD, mientras que los permetilados, más anfifílicos y sin grupos OH, tienen capacidad estabilizante de acuerdo también a datos de literatura para CD permetiladas. Este análisis está de acuerdo con la solubilidad restringida de los monómeros y polímeros y con los datos de solubilidad reportados en la literatura para la  $\beta$ -CD<sup>35-36</sup>.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

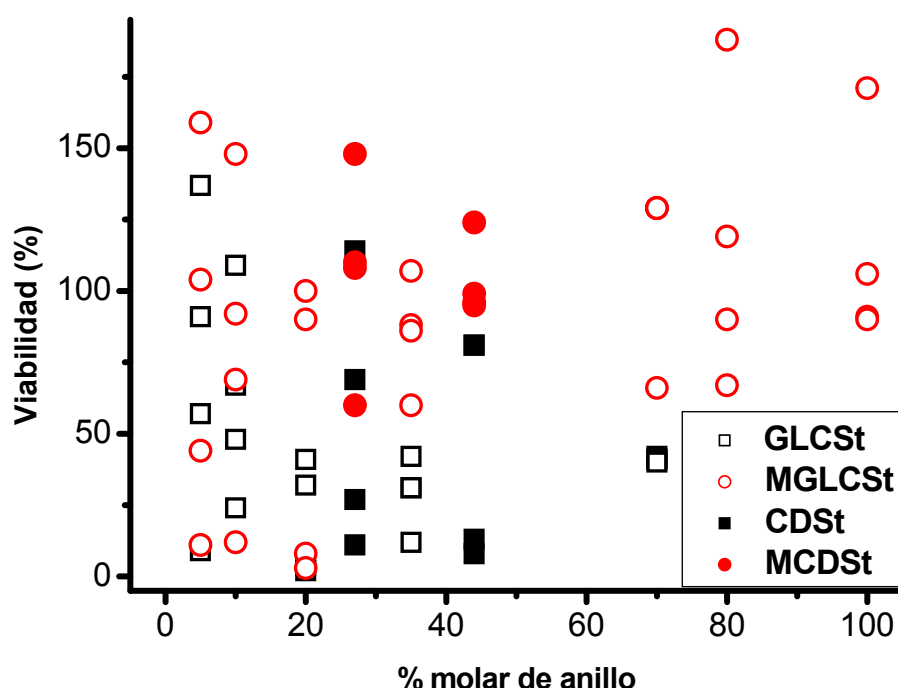


**Figura 3.22.** Tamaño de partícula de los *polyplexes* en función de la carga molar de anillo glucosídico.

#### Influencia de la estructura copolimérica en la viabilidad celular

En la **figura 3.23** se han representado los datos de viabilidad de la línea 3T3 en función de la cantidad molar de anillos glucosídicos. En ella se puede observar que los derivados hidroxilados, dentro de la variabilidad característica de este tipo de estudios, parecen ser más tóxicos que los permetilados. En muchos casos estos copolímeros polihidroxilados han mostrado mayor citotoxicidad que el control EPA<sub>100</sub>, lo que parece sugerir que la propia unidad glucosídica no permetilada contribuye junto con la carga positiva a la citotoxicidad. Esta diferencia asociada a la permetilación es más evidente para los derivados de CD. En el caso de los derivados de glucosa, se mantiene esta diferencia en el promedio de los valores, pero un análisis más cuidadoso parece sugerir que existe un efecto sinérgico de las dos unidades en la citotoxicidad para cierto balance de cargas (EPA y ADN) y unidades glucosídicas, para ambos tipos de glucosas.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección



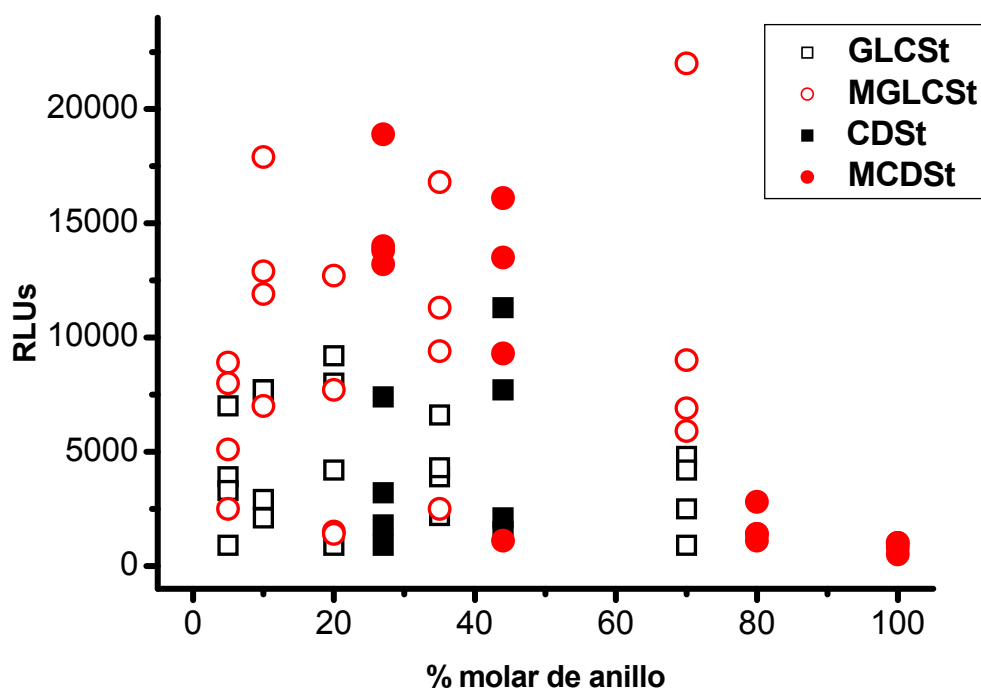
**Figura 3.23.** Porcentaje de viabilidad de los fibroblastos Swiss 3T3 en función de la carga molar de anillo glucosídico.

Un aspecto muy interesante de este estudio es que ha mostrado que algunos de los sistemas derivados de MCDSt y MGLCSt poseen una toxicidad diferencial hacia células tumorales comparadas con las 3T3, especialmente en el caso de los derivados de MGLCSt con mayor carga glucosídica. En este tipo de sistemas, la mayoría de los complejos derivados de MGLC<sub>35</sub> y MGLC<sub>70</sub> son citocompatibles o poco citotóxicos con las células Swiss pero muy tóxicos con las tumorales B16, presentando además estos sistemas una alta eficiencia de transfección en estas condiciones. Este resultado es sumamente interesante, no sólo debido a su toxicidad ‘selectiva’ o diferencial hacia las células tumorales, sino también debido a su alta eficiencia de transfección en ambas líneas celulares, lo que nos permitiría llevar a cabo, en un hipotético futuro trabajo, una transfección con un gen que afectara de forma selectiva las células tumorales sin afectar a las células control. De esta forma obtendríamos un sistema capaz de atacar selectivamente a este tipo de células, introduciendo además un gen que permita la eliminación de las células tumorales supervivientes, sin afectar de forma significativa a las células sanas presentes en este tejido. Sin embargo, para llevar a cabo este estudio se deberían llevar a cabo antes estudios previos con estos sistemas *in vivo*, utilizando diferentes modelos animales, ya que los resultados presentados en esta tesis doctoral se limitan a experimentos *in vitro*, en ausencia de suero, lo que no nos permite saber si estos sistemas presentarían la misma eficiencia, o si simplemente presentarían un comportamiento similar, en el interior de un organismo vivo.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### Influencia de la estructura copolimérica en la eficiencia de transfección

En la **figura 3.24** se han representado los datos de eficiencia de transfección en células Swiss en función de la cantidad molar de anillos glucosídicos.



**Figura 3.24.** Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 en función de la carga molar de anillo glucosídico.

De forma genérica se puede decir que para cada grupo, existen condiciones de composición y relación N/P en las que los copolímeros son claramente más eficientes que el control EPA<sub>100</sub>. Esto quiere decir que la incorporación de cualquiera de las unidades encuentra una ventana de condiciones en las que la unidad glucosídica tiene un efecto beneficioso sobre la funcionalidad del vector, probablemente debido a su mayor anfifilia (y mayor lipofilia) poseen una mayor capacidad de interacción con los lípidos de membrana, facilitando la entrada del material genético al interior de la célula<sup>38</sup>. Sin embargo, existen profundas diferencias entre los diferentes grupos. Los resultados indican que los derivados permetilados son más eficientes que los no permetilados. Los no permetilados, también de forma genérica, son más eficientes a bajas relaciones N/P, probablemente debido a la mayor citotoxicidad de estos sistemas que es más relevante a altas N/P. En el caso de los derivados de CD permetilados y no permetilados, que sí son comparables, se observa claramente esta superioridad asociada a la permetilación.

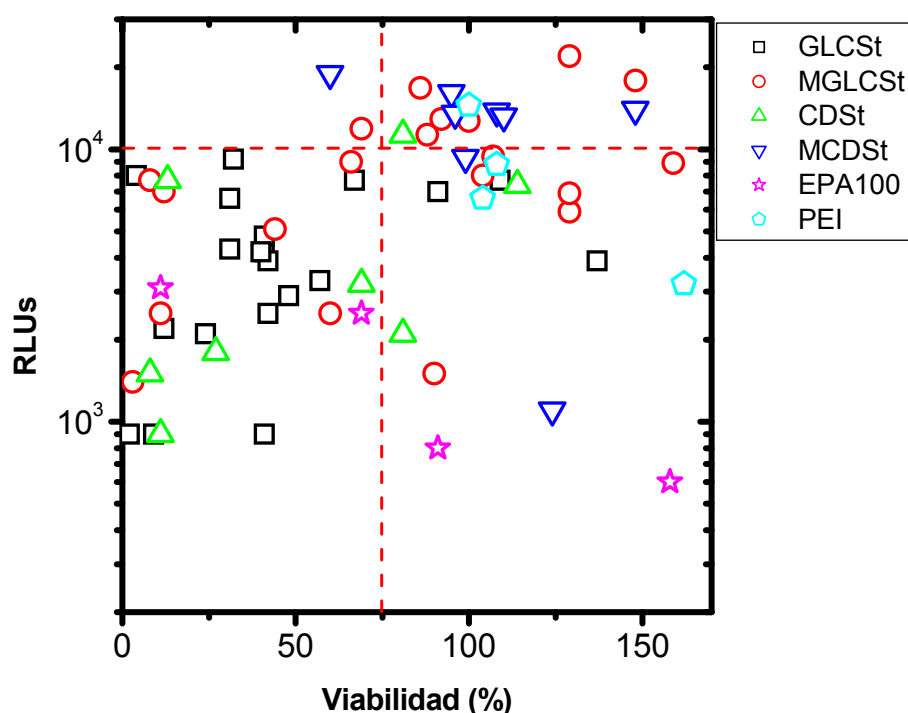
Además, el balance global transfección/viabilidad también es claramente favorable a las estructuras permetiladas. De hecho, los mejores sistemas que podríamos definir como



### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

elegibles para la aplicación, y que son superiores a los controles en el balance global transfección/citotoxicidad en las dos líneas celulares, son todos ellos permitilados como por ejemplo MCDSt<sub>10</sub>, MGLCSt<sub>10</sub> o MGLCSt<sub>70</sub>. El derivado MGLCSt<sub>70</sub> tiene un balance de propiedades muy singular pues son muy eficientes a pesar de tener carga negativa, lo que sugiere cierto tipo de interacción específica del sistema con la membrana. Por otra parte, se puede decir que de acuerdo a este balance global los derivados de GLCSt no son apropiados para esta aplicación.

En la **figura 3.25** se han representado conjuntamente todos los datos. Se observa que en el cuadrante superior derecha, que recoge los mejores sistemas en balance transfección/viabilidad, hay una mayoría de derivados permitilados además de un control PEI.



**Figura 3.25.** Polímeros glucosídicos. Representación la eficiencia de transfección de los diferentes polímeros frente a su viabilidad en fibroblastos Swiss 3T3 a las diferentes relaciones N/P estudiadas. No se han representado aquellos sistemas que no han sido capaces de complejar.

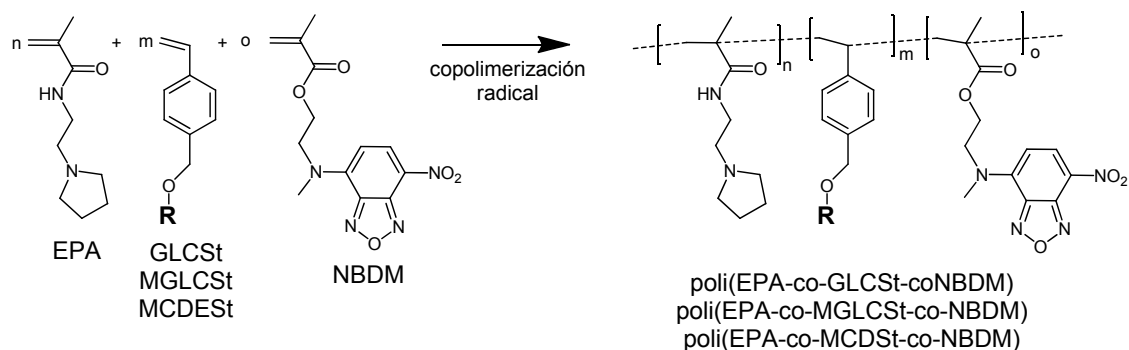
### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

#### 3.3.3. Ensayo preliminar de transfección con derivados fluorescentes de los polímeros glucosídicos

Los resultados obtenidos con los vectores glucosídicos en eficiencia de transfección y viabilidad celular son variados y complejos de analizar y apuntan a aspectos y procesos celulares de gran interés como son interacciones de membrana, efecto de la permetilación en dichas interacciones y en la liberación del ADN, relevancia en estos aspectos de la estructura supramolecular de la CD, etc. Aclarar algunas de estas cuestiones abiertas por este estudio, y profundizar en los mecanismos celulares que son sensibles a los mencionados parámetros estructurales, es un reto futuro de gran interés. Como se ha mencionado en la Introducción de este capítulo, una vía para avanzar en estos aspectos, es marcar los vectores con sondas fluorescentes para intentar '*observar*' el proceso intracelular, así como el '*viaje*' que hacen los *polyplexes* desde que son puestos en contacto con el cultivo celular hasta que el gen de la luciferasa se expresa. La sonda fluorescente permitiría la monitorización del proceso usando técnicas microscópicas como la microscopia confocal.

En este sentido, en esta parte final del estudio se presenta una vía de marcaje fluorescente de los polímeros así como un ensayo preliminar de cultivo celular en presencia de polímeros marcados y monitorización del cultivo por microscopía de fluorescencia. El marcaje se ha llevado a cabo sintetizado polímeros glucosídicos en idénticas condiciones a los polímeros originales, aunque añadiendo un 1% molar del monómero fluorescente NBDM (figura 3.2). Los polímeros elegidos para este estudio preliminar fueron los sistemas con 5 y 10% molar de MCDSt, GLCSt y MGLCSt, aunque las series se han identificado como USt<sub>z</sub>-F.

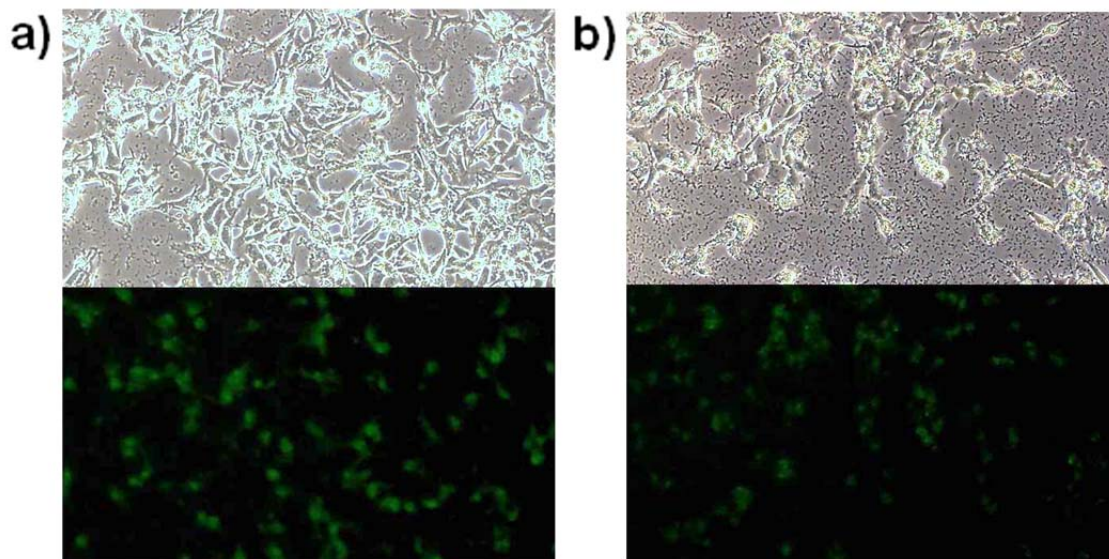
Este marcaje se ha podido llevar a cabo de forma sencilla gracias a la aproximación *bottom-up* de síntesis de monómeros precursores y copolimerización explorada en este trabajo de tesis (ver figura 3.26). Una vez llevada a cabo la síntesis de un metacrilato polimerizable portador de la sonda fluorescente (NBDM), se han podido obtener copolímeros similares a los estudiados en este trabajo simplemente añadiendo la cantidad elegida de precursor en la copolimerización.



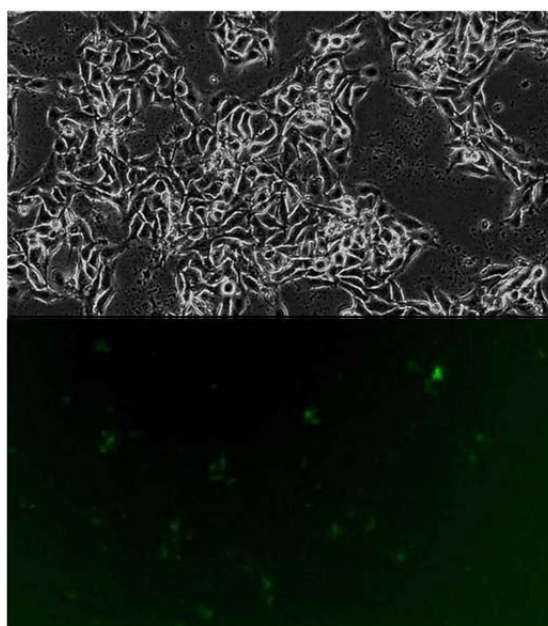
**Figura 3.26.** Esquema de la estructura de los monómeros y de la preparación de los copolímeros fluorescentes sintetizados en este ensayo preliminar.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Una vez preparados estos copolímeros conjugados con las mencionadas sondas fluorescentes, se ha llevado a cabo un ensayo celular in vitro, realizado con el mismo protocolo que el explicado para los polímeros glucosídicos, observando el cultivo celular con ayuda de un microscopio de fluorescencia 4, 24 y 48 horas después de la transfección. En la **figuras 3.27 y 3.28** se muestran algunas de las imágenes más representativas obtenidas de cada una de las series poliméricas estudiadas.



**Figura 3.27.** Micrografías obtenidas 4 horas tras la transfección de fibroblastos Swiss 3T3. a) Derivado fluorescente del polímero MCDSt<sub>10</sub>, relación N/P 2/1. b) Derivado fluorescente del polímero MGLCSt<sub>10</sub>, relación N/P 8/1. Las micrografías fueron realizadas con un microscopio fluorescente, utilizando un nivel de magnificación 10x.



**Figura 3.28.** Micrografías obtenidas 24 horas tras la transfección de fibroblastos Swiss 3T3, con el derivado fluorescente del polímero GLCSt<sub>5</sub>, relación N/P 2/1. Las micrografías fueron realizadas con un microscopio fluorescente, utilizando un nivel de magnificación 10x.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

Como se muestra en las **figuras 3.27 y 3.28**, se puede observar en color verde las células que han internalizado los *polyplexes* 4 horas después de iniciar el proceso de transfección, tanto en el caso de los polímeros derivados de CDSt<sub>2</sub>-F como de los derivados de MGLCSt<sub>2</sub>-F. Sin embargo, los polímeros derivados de GLCSt<sub>2</sub>-F no son visibles hasta pasadas al menos 24 horas tras la transfección, mostrando en este punto una gran cantidad de células fluorescentes, es decir, una alta eficiencia de internalización de los complejos. Este resultado podría indicar que los bajos niveles de transfección mostrados por estos polímeros pueden ser debidos a que estos sistemas necesitan más tiempo para internalizarse en la célula. Para poder llevar a cabo posteriores estudios se debe optimizar este método mediante la preparación de muestras para su observación con un microscopio confocal, que permitiría observar en detalle la estructura celular, y la localización de los polímeros fluorescentes dentro de ella.

Por tanto, se ha puesto a punto una vía de marcaje fluorescente de los vectores y se ha demostrado su utilidad en ensayos celulares preliminares. Todo ello abre la vía a futuros estudios que permitan profundizar en la localización y tipo de interacción de los vectores estudiados en este trabajo. En un primer contacto con esta técnica ya se han podido observar diferencias de comportamiento entre las diferentes series poliméricas que podrían ser relacionadas con su comportamiento observado en los ensayos de transfección y viabilidad celular llevados a cabo.

#### 3.4. Bibliografía

1. S. Y. Wong, J. M. Pelet, D. Putnam. Polymers for gene delivery: past, present and future. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 799–837
2. T. Merdan, J. Kopecek, T. Kissel. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, 54, 715–758
3. J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z. R. Lu. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, 61-81
4. H. J. Yoon, S. B. Jeon, K. Suk, D. K. Choi, Y. J. Hong, E. J. Park. Contribution of TLR2 to the Initiation of Ganglioside-triggered Inflammatory Signaling. *Mol. Cells* **2007**, 25, 1, 99-104
5. R. Zidovetzki, I. Levitan. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, 1768, 1311–1324.
6. H. Ohvo, P. Slotte. Cyclodextrin-Mediated Removal of Sterols from Monolayers: Effects of Sterol Structure and Phospholipids on Desorption Rate. *Biochemistry* **1996**, 35, 8018-8024
7. S. L. Niu, B. J. Litman. Determination of Membrane Cholesterol Partition Coefficient Using a Lipid Vesicle–Cyclodextrin Binary System: Effect of Phospholipid Acyl Chain Unsaturation and Headgroup Composition. *Biophysical Journal* **2002**, 83, 3408 –3415
8. D. Schmaljohann. Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2006**, 58, 1655–1670
9. D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, P. S. Stayton. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat Rev Drug Discov.* **2005**, 4, 7, 581-93.
10. C. H. Xu, M.H. Sui, J. B. Tang, Y. Q. Shen. What can we learn from virus in designing nonviral gene vectors. *Chinese Journal of Polymer Science* **2011**, 29, 3, 274-287
11. R. N. Cohen, M. A. E. M. van der Aa, N. Macaraeg, A. P. Lee, F. C. Szoka Jr. Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *Journal of Controlled Release* **2009**, 135, 166–174
12. R. Amini, H. Hosseinkhani, A. S. Abdulmir, R. Rosli, F. A. Jalilian. Engineered Smart Biomaterials for Gene Delivery. *Gene Therapy and Molecular Biology.* **2012**, 14, 72
13. G. Odian. Principles of polymerization. 3ª Edición. Wiley Interscience **1991**
14. D. Oupicky, M. Ogris, K. A. Howard, P. R. Dash, K. Ulbrich, L. W. Seymour. Importance of Lateral and Steric Stabilization of Polyelectrolyte Gene Delivery Vectors for Extended Systemic Circulation. *Mol. Ther.* **2002**, 5, 4, 463-472
15. Y. Takakura, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida. Influence of physicochemical properties on pharmacokinetics of non-viral vectors for gene delivery. *J Drug Target* **2002**, 10, 2, 99-104
16. D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* **2003**, 24, 1121–1131
17. R. S. Jardine, P. Bartlett. Synthesis of non-aqueous fluorescent hard-sphere polymer colloids. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2002**, 211, 127-132
18. D. Velasco, E. Collin, J. San Román, A. Pandit, C. Elvira. End functionalized polymeric system derived from pyrrolidine provide high transfection efficiency. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2011**, 79, 485–494
19. D. Velasco, G. Réthoré, B. Newland, J. Parra, C. Elvira, A. Pandit, L. Rojo, J. San Román. Low polydispersity (N-ethyl pyrrolidine methacrylamide-co-1-vinylimidazole) linear oligomers for gene therapy applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, 82, 465–474

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

20. J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, 267, 5421-5426
21. M. Pavlin, V. B. Bregar. Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures.* **2012**, 4, 1389-1400
22. D. Lechardeur, K. J. Sohn, M. Haardt. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther.* **1999**, 6, 482-497
23. W. T. Godbey, K. K. Wu, A. G. Mikos. Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability. *Biomaterials* **2001**, 22, 471-480
24. L. Sprincl, J. Exner, O. Sterba, J. Kopecek. New types of synthetic infusion solutions. III. Elimination and retention of poly-[N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide] in a test organism. *J Biomed Mater Res* **1976**, 10, 953-956
25. R. Duncan. Drug-polymer conjugates: potential for improved chemotherapy. *Anticancer drugs* **1992**, 3, 175-210.
26. J. Kopecek, P. Kopeckova, T. Minko, Z. R. Lu. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, 50, 61-81
27. F. Kratz et al. Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. Carrier-linked prodrugs. *Chem Med Chem* **2008**, 3, 20-53.
28. J. Kopecek, P. Kopeckova. HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 122-149
29. D. Zhou, C. Li, Y. Hu, H. Zhou, J. Chen, Z. Zhang, T. Guo. Glycopolymer modification on physicochemical and biological properties of poly(l-lysine) for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules* **2012**, 50, 965- 973
30. K. Ulbrich, V. Subr. Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 150-166
31. R. S. Burke, S. H. Pun. Synthesis and Characterization of Biodegradable HPMA-Oligolysine Copolymers for Improved Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.* **2010**, 21, 140-150
32. J. Kopecek, P. Kopeckova. HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2010**, 62, 122-149
33. J. G. Schellinger, J. A. Pahang, R. N. Johnson, D. S. H. Chu, D. L. Sellers, D. O. Maris, A. J. Convertine, P. S. Stayton, P. J. Horner, S. H. Pun. Melittin-grafted HPMA-oligolysine based copolymers for gene delivery. *Biomaterials* **2013**, 34, 2318-2326
34. M. Laird Forrest, N. Gabrielson, D. W. Pack. Cyclodextrin-Polyethylenimine Conjugates for Targeted In Vitro Gene Delivery. *Biotechnology and bioengineering*, **2005**, 89, 4, 417-423
35. E. G. Doyagüez, J. Rodríguez-Hernández, G. Corrales, A. Fernández-Mayoralas, A. Gallardo. Water-Soluble Pendant Copolymers Bearing Proline and Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin: pH-Dependent Catalytic Nanoreactors. *Macromolecules.* **2012**, 45, 7676-7683
36. M. E. Davis, M. E. Brewster. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* **2004**, 312, 1023-35.
37. T. Irie, K. Uekama. Cyclodextrins in peptide and protein delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, 36, 101-123
38. P. Y. Grosse, F. Bressolle, F. Pinguet. Methyl- $\beta$ -cyclodextrin in HL-60 parental and multidrug-resistant cancer cell lines: effect on the cytotoxic activity and intracellular accumulation of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* **1997**, 40, 489-494

## **4. Conclusiones**





## 4. Conclusiones

1. En este trabajo se han sintetizado y caracterizado vectores poliméricos basados en copolímeros estadísticos binarios de dos tipos de unidades, una portadora de aminas terciarias cationizables y otra unidad neutra complementaria. Los copolímeros se han obtenido adecuadamente mediante copolimerización radical convencional de parejas de monómeros precursores de ambos tipos, en diferentes relaciones molares de ambos. Se han preparado dos familias de vectores agrupados en función de la naturaleza de la unidad neutra, 1.- metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo), HPMA, y 2.- diferentes derivados glicosídicos. Se ha evaluado la influencia de cada uno de estos dos tipos de unidades neutras en las propiedades como vectores de las dos familias copolímeros cationizables: complejación con ADN, respuesta celular y eficiencia de transfección, estos últimos *in vitro*.
2. Para la familia de copolímeros binarios con HPMA, los comonómeros precursores portadores de aminas terciarias cationizables elegidos han sido la metacrilamida de *N*-(2-aminoetil pirrolidina), EPA, y dos metacrilatos (denominados Ta y Te) que incorporan la triamina prodendrítica *N,N,N',N'*-tetraetildietilentriamina, TEDETA. Estos monómeros Ta y Te se han obtenido mediante una ruta descrita por primera vez en este trabajo basada en una adición de Michael selectiva sobre entrecruzantes diacrílicos asimétricos. La adición selectiva sobre acrilato al usar como precursor el entrecruzante metacrilato/acrilato da lugar a un  $\beta$ -aminoéster lateral hidrolizable (cuya rotura libera un derivado de TEDETA), mientras que la adición selectiva sobre acrilamida al usar el entrecruzante metacrilato/acrilamida da lugar a una  $\beta$ -aminoamida estable. Ta y Te, al igual que EPA, confieren una doble sensibilidad a los copolímeros derivados de ellos ya que dichas unidades además de ser sensibles al pH por la presencia de las aminas cationizables, muestran termosensibilidad tipo LCST, con temperaturas de transición dependientes del pH aunque superiores a 37 °C para valores de pH iguales o inferiores a 9.
3. En esta familia de copolímeros binarios con HPMA, la presencia de dicho monómero neutro en los copolímeros catiónicos incrementa por una parte su citocompatibilidad, siendo mayor ésta cuando se incrementa proporción de HPMA. Por otra parte, al aumentar la proporción de HPMA en el copolímero se aumenta sensiblemente la eficiencia de transfección de los vectores, para luego disminuir debido la mayor dificultad de la interacción entre los grupos amino de las unidades cationizables y el ADN. Existe una determinada proporción en la que se obtienen sistemas con altos niveles de citocompatibilidad y alta eficiencia de transfección, superiores en este balance a cualquiera de los controles. Este resultado demuestra que la combinación estadística de estas dos unidades a lo largo de la cadena (una disposición estructural poco reportada en la literatura) puede tener un efecto beneficioso en las propiedades finales, posiblemente debido a la modulación de las propiedades del complejo y de la respuesta celular al mismo (internalización, liberación

#### 4. Conclusiones

citoplasmática, etc.) ejercida por la presencia de HPMA como unidad vecina al EPA cationizable en la cadena. Destaca en este balance combinado transfección/citocompatibilidad el copolímero poli(EPA-co-HPMA) 50:50.

4. En el caso de la familia de copolímeros binarios con unidades neutras glucosídicas, el comonomero precursor portador de amina terciaria elegido ha sido el EPA. Los monómeros precursores glicosídicos se han elegido de entre cuatro estructuras estirénicas con sustituyentes laterales portadores, a través de un anillo triazol (derivado del acoplamiento click usado en la síntesis), de  $\alpha$ -glucosa (monómero GLCSt),  $\alpha$ -glucosa permetilada (MGLCSt),  $\beta$ -ciclodextrina (CDSt) o  $\beta$ -ciclodextrina permetilada (MCDSt).
5. La utilización de derivados permetilados tanto de  $\alpha$ -glucosa como de  $\beta$ -CD, da lugar a *polyplexes* con un tamaño de partícula inferior en promedio al obtenido con los polímeros derivados de la forma hidroxilada de estos azúcares, lo cual está de acuerdo con el carácter agregativo de estos últimos debido a la facilidad de formación de enlaces de H, y con el carácter estabilizante de los derivados permetilados.
6. La permetilación tiene una influencia en la citocompatibilidad de los polímeros, mostrando en todos los casos niveles de viabilidad celular superiores a los obtenidos con sus homólogos polihidroxilados y con los polímeros controles, destacando en este aspecto de citocompatibilidad el polímero MCDSt<sub>10</sub>. Este comportamiento diferencial se puede atribuye a la mayor anfifilia de los derivados permetilados, que permite una mayor interacción con la membrana celular.
7. Todos los polímeros glucosídicos, permetilados o no, han mostrado un comportamiento muy similar en eficiencia de transfección en los ensayos realizado sobre fibroblastos Swiss 3T3 comparados con aquellos llevados a cabo sobre células tumorales B16. La única diferencia observada fue que en todos los casos los niveles de transfección en las células tumorales fueron cercanos o, incluso, superiores al doble de los obtenidos en los fibroblastos. El comportamiento en viabilidad celular también es comparable entre las dos líneas excepto para los sistemas derivados de la forma permetilada de glucosa MGLCSt<sub>35</sub> y MGLCSt<sub>70</sub>, así como el CDSt<sub>5</sub> y CDSt<sub>20</sub> (éstos últimos en menor medida), que han mostrado una interesante toxicidad diferencial, siendo citotóxicas sobre las células tumorales estudiadas y citocompatibles sobre las Swiss; son candidatos prometedores para futuros estudios en terapia génica y terapia anticancerígena.
8. Se ha puesto a punto una vía de marcado fluorescente de los vectores poliméricos mediante preparación de un monómero fluorescente seguida de copolimerización (usando dicho monómero fluorescente en muy pequeño porcentaje molar) en idénticas condiciones a las usadas para obtener los copolímeros originales.

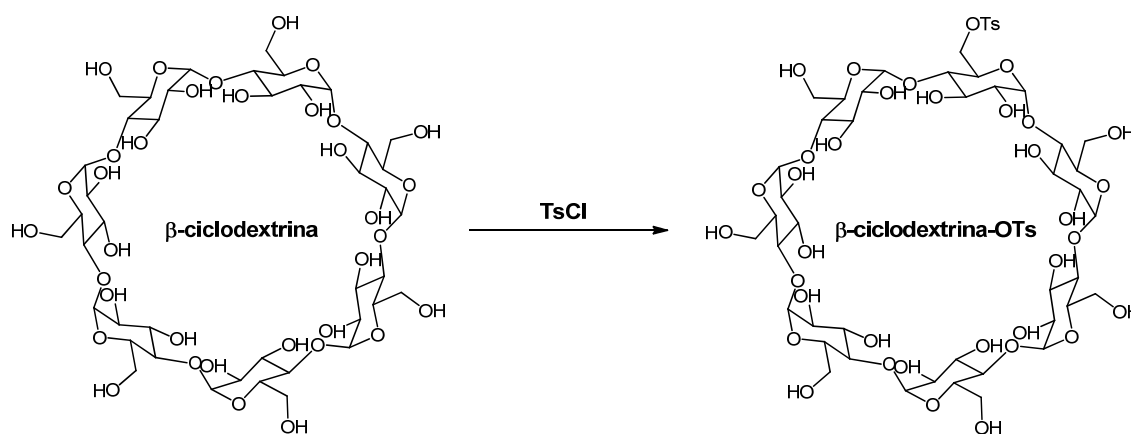
**Anexo**



## A. Síntesis y caracterización de los monómeros glucosídicos sintetizados por el grupo de Química Orgánica Biológica para este trabajo

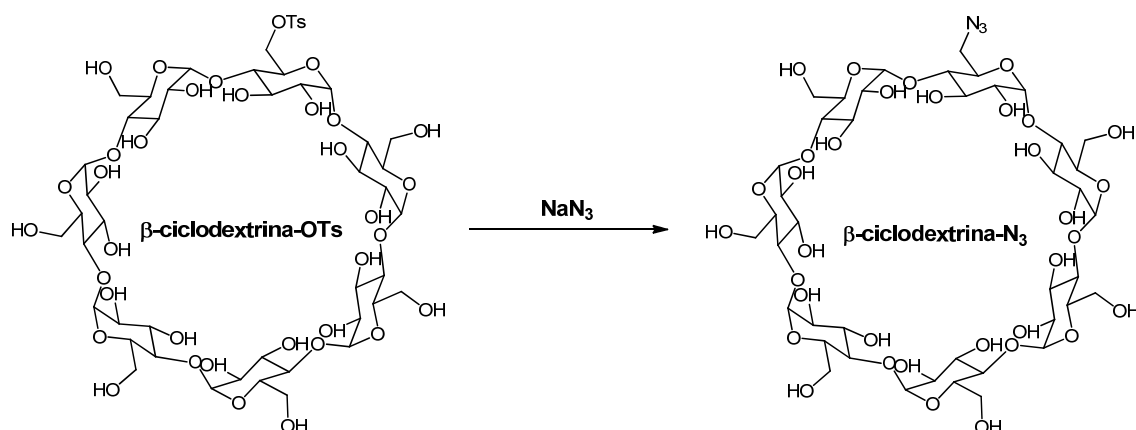
### A.1. Síntesis del monómero estirénico derivado de $\beta$ -ciclodextrina (CDSt)

Sobre una disolución de  $\beta$ -ciclodextrina (6 g; 5,28 mmol) en 267 mL de agua se adicionaron una disolución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (3,967 g; 15,89 mmol) en 289 mL de agua y una disolución de NaOH (5,29 g; 132 mmol) en 267 mL de agua. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se añadió gota a gota una disolución de cloruro de tosilo durante 4,5 horas. La suspensión se neutralizó a pH 7 por adición de HCl 1N (viraje de azul intenso a azul claro), y el precipitado se filtró sobre celita, concentrándolo hasta 2/3 de su volumen inicial. Se obtuvieron 3,09 g (45,3 %) de producto, denominado ciclodextrina-OTs.



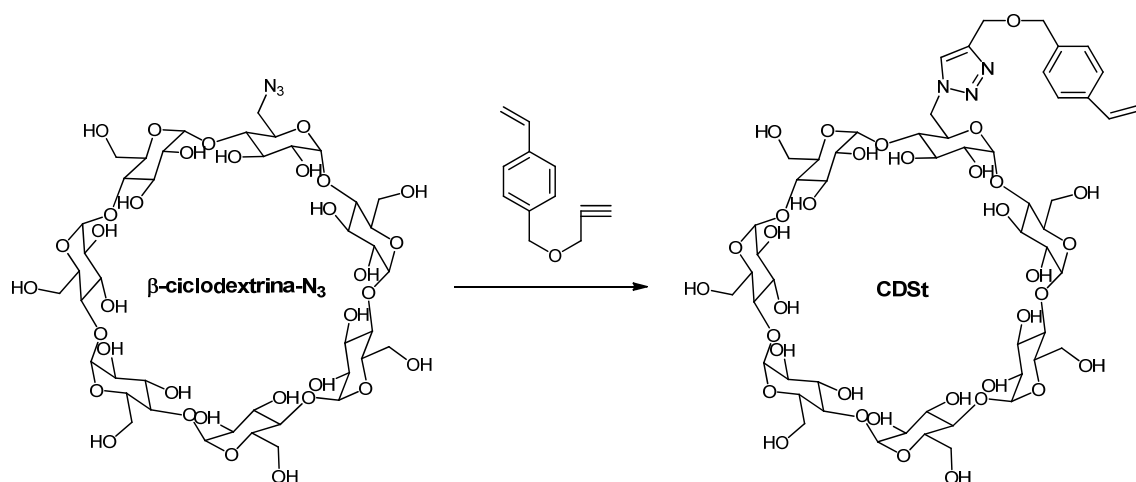
**Figura A.1.** Primer paso de la síntesis del monómero CDSt. Tosilación de la  $\beta$ -ciclodextrina para obtener el derivado monotosilado  $\beta$ -ciclodextrina-OTs.

A continuación, 2,95 g (2,29 mmol) de  $\beta$ -ciclodextrina-OTs fueron disueltos en 9,3 mL de DMF, añadiendo 163 mg (2,5 mmol) de  $\text{NaN}_3$ . La mezcla se agitó a 100 °C durante 4 horas. Pasado este tiempo se enfrió, y el producto de reacción se precipitó por la adición de 200 mL de acetona. Este sólido blanco (ciclodextrina- $\text{N}_3$ ) se filtró y se lavó con acetona y éter, obteniendo 2,98 g.

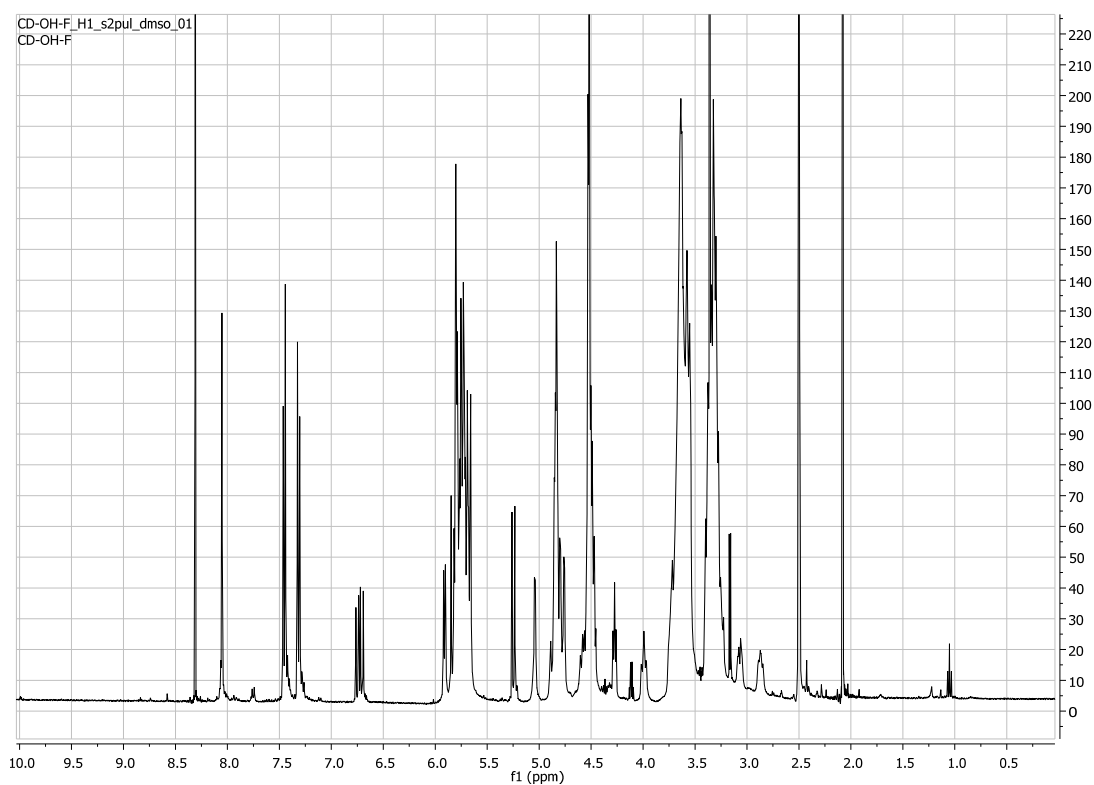


**Figura A.2.** Segundo paso de la síntesis del monómero CDSt. Tratamiento de la  $\beta$ -ciclodextrina-OTs con azida sódica, para obtener el derivado  $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$ .

A una disolución de esta  $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$  (1,00 g; 0,862 mmol) en 37 mL de DMF/ $H_2O$  (1:1) se le añadieron sucesivamente éter propargílico de 4-vinilbencilo (297 mg; 1,724 mmol),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (144 mg; 0,577 mmol) y ascorbato sódico (103 mg; 0,52 mmol). La mezcla se calentó a 80 °C durante 3 horas. Después de este tiempo se eliminó el disolvente a vacío y el residuo fue extraído en metanol y lavado con acetato de etilo. El rendimiento final de la reacción fue del 43%.



**Figura A.3.** Tercer y último paso de la síntesis del monómero CDSt, mediante una reacción de química click entre la  $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$  y el éter propargílico de 4-vinilbencilo para obtener el monómero CDSt.

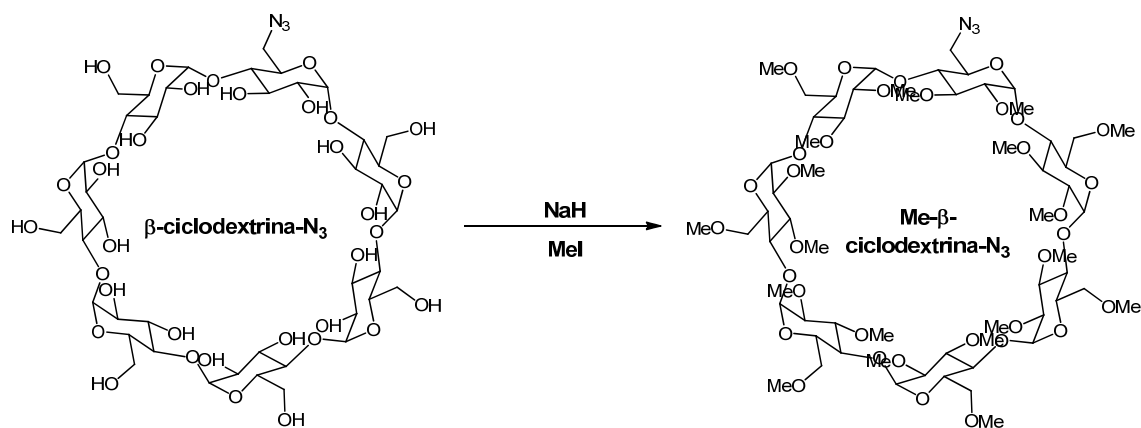


$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, dmsO)  $\delta$  8.05 (s, 1H), 7.45 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 2H), 6.73 (dd,  $J$  = 17.7, 11.0 Hz, 1H), 5.91 (d,  $J$  = 6.5 Hz, 1H), 5.75 (m, 14 H), 5.25 (dd,  $J$  = 10.9, 0.7 Hz, 1H), 5.04 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 1H), 4.91 – 4.71 (m, 7H), 4.63 – 4.42 (m, 9H), 4.27 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H), 3.99 (t,  $J$  = 9.9 Hz, 1H), 3.75 – 3.47 (m, 22H), 3.46 – 3.21 (m, 20H), 3.16 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 3.07 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 1H), 2.86 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H).

**Figura A.4.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del monómero CDSt, obtenido a 400 MHz, utilizando  $d_6\text{DMSO}$  como disolvente.

## A.2. Síntesis del monómero estirénico derivado de la forma permetilada de $\beta$ -ciclodextrina (MCDSt)

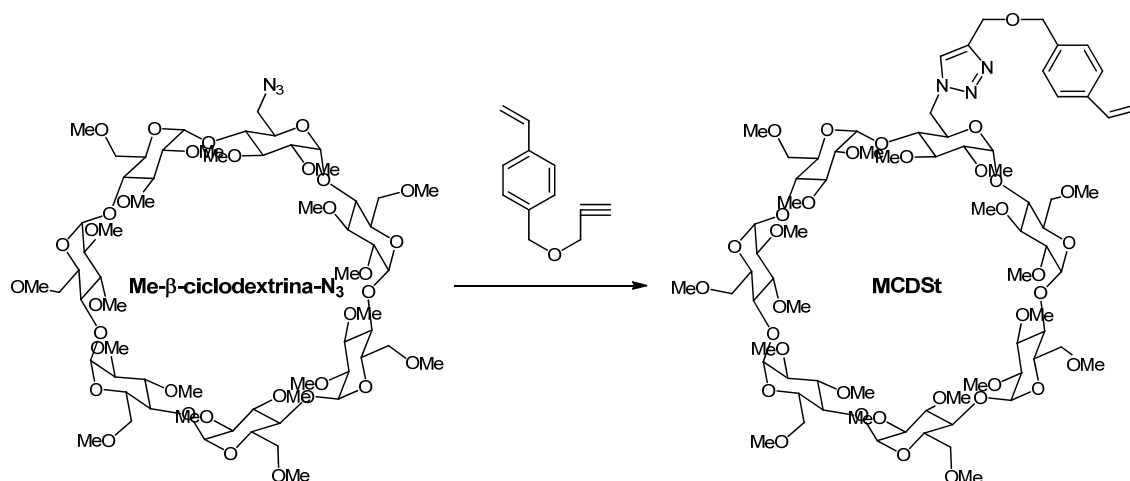
La permetilación del derivado  $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$  fue llevada a cabo disolviendo 990 mg (0,853 mmol) de este compuesto en 34 mL de DMF, y añadiendo 2,5 mg (102,4 mmol) de NaH. Esta mezcla fue sonicada durante 15 minutos en un baño de agua. A continuación se añadió yoduro de metilo (2,56 mL) y se continuó sonicando durante otros 15 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con agua, se extrajo con diclorometano y la fase orgánica se secó con  $Na_2SO_4$ . Después de evaporar el disolvente orgánico, el residuo se purificó por columna de sílice, obteniendo 650 mg (53%) de Me- $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$ .



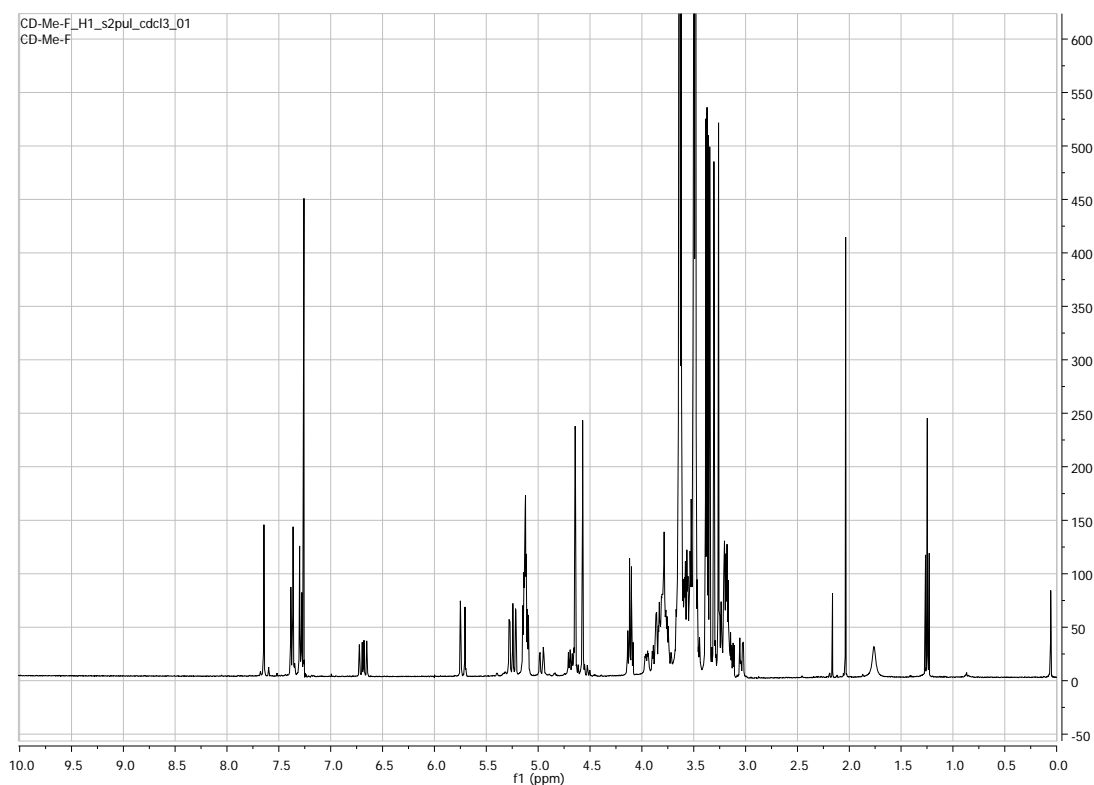
**Figura A.5.** Primer paso de la síntesis del monómero MCDSt. Permetilación de la  $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$  para obtener el derivado Me- $\beta$ -ciclodextrina- $N_3$ .

A una disolución de este producto (630 mg; 0,437 mmol) en 16 mL de DMF/ $H_2O$  (1:1), se le añadieron sucesivamente éter propargílico de 4-vinilbencilo (151 mg; 0,877 mmol),  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  (72 mg; 0,288 mmol) y ascorbato sódico (86 mg; 0,434 mmol). La mezcla se calentó en microondas (20 minutos, 80  $^{\circ}C$ ), y después se diluyó en 50 mL de agua, se extrajo en diclorometano (3x100 mL) y se secó utilizando  $Na_2SO_4$ . El disolvente fue eliminado a vacío. El residuo obtenido se purificó por columna de sílice, obteniendo 421 mg de monómero, un 60% de rendimiento.





**Figura A.6.** Segundo paso de la síntesis del monómero MCDSt, mediante una reacción de química click entre la Me-β-ciclodextrina-N<sub>3</sub> y el éter propargílico de 4-vinilbencilo para obtener el monómero MCDSt.

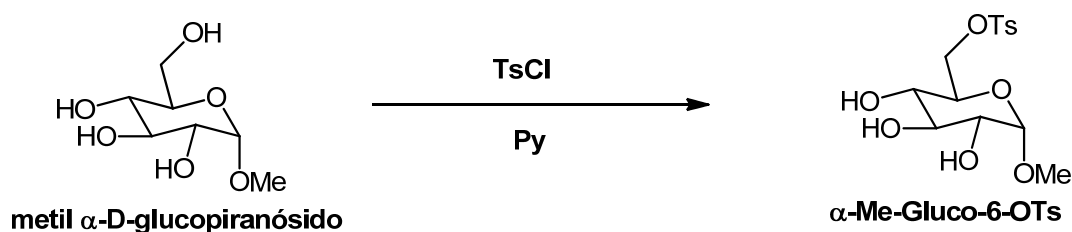


<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.66 (d,  $J$  = 13.8 Hz, 1H), 7.36 (dd,  $J$  = 9.6, 5.1 Hz, 2H), 7.29 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H), 6.69 (dd,  $J$  = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.72 (dt,  $J$  = 17.6, 1.8 Hz, 1H), 5.28 (d,  $J$  = 3.7 Hz, 1H), 5.23 (dd,  $J$  = 10.9, 0.8 Hz, 1H), 5.19 – 5.06 (m, 5H), 4.97 (dd,  $J$  = 14.3, 2.5 Hz, 1H), 4.67 – 4.52 (m, 4H), 3.95 (dd,  $J$  = 9.4, 2.5 Hz, 1H), 3.70 – 2.95 (m, 74H).

**Figura A.7.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero MCDSt, obtenido a 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente.

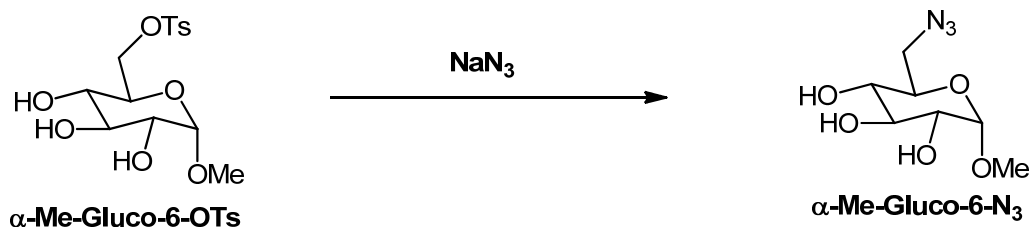
### A.3. Síntesis del monómero estirénico derivado de $\alpha$ -glucosa (GLCSt)

Para la síntesis de este monómero se siguió un procedimiento similar al descrito para el mismo compuesto en la referencia [1]. 4 g (20,6 mmol) de metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido fueron disueltos en 4,8 mL de piridina seca, en baño de hielo. A esta disolución se le añadieron 3,93 g (20,6 mmol) de cloruro de tosilo en pequeñas porciones, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Al cabo de este tiempo la mezcla de reacción fue lavada varias veces con hexano y tolueno con el objetivo de eliminar la piridina. El producto se purificó mediante una columna de sílice, obteniendo 2,34 g (32,6%) de producto.



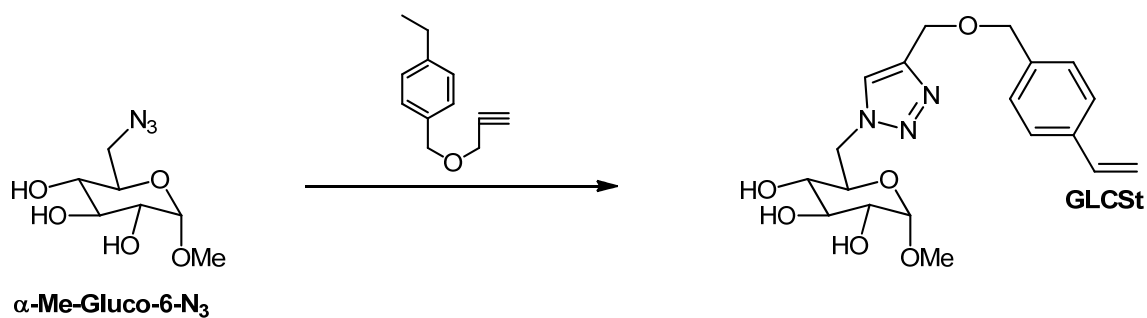
**Figura A.8.** Primer paso de la síntesis del monómero GLCSt, Tosilación del metil  $\alpha$ -D-glucopiranosido para obtener el derivado monotosilado  $\alpha$ -Me-Gluco-6-OTs.

Este compuesto fue disuelto (2,00 g; 5,74 mmol) en 10 mL de DMF y se añadieron 1,45 g (22,3 mmol) de  $\text{NaN}_3$ . La mezcla se agitó a 115 °C durante 18 horas en atmósfera de argón. Al cabo de este tiempo la mezcla se enfrió y concentró a vacío. El producto se purificó con una columna de sílice. Se obtuvieron 1,13 g (90%) de producto,  $\alpha$ -Me-Gluco-6- $\text{N}_3$ .

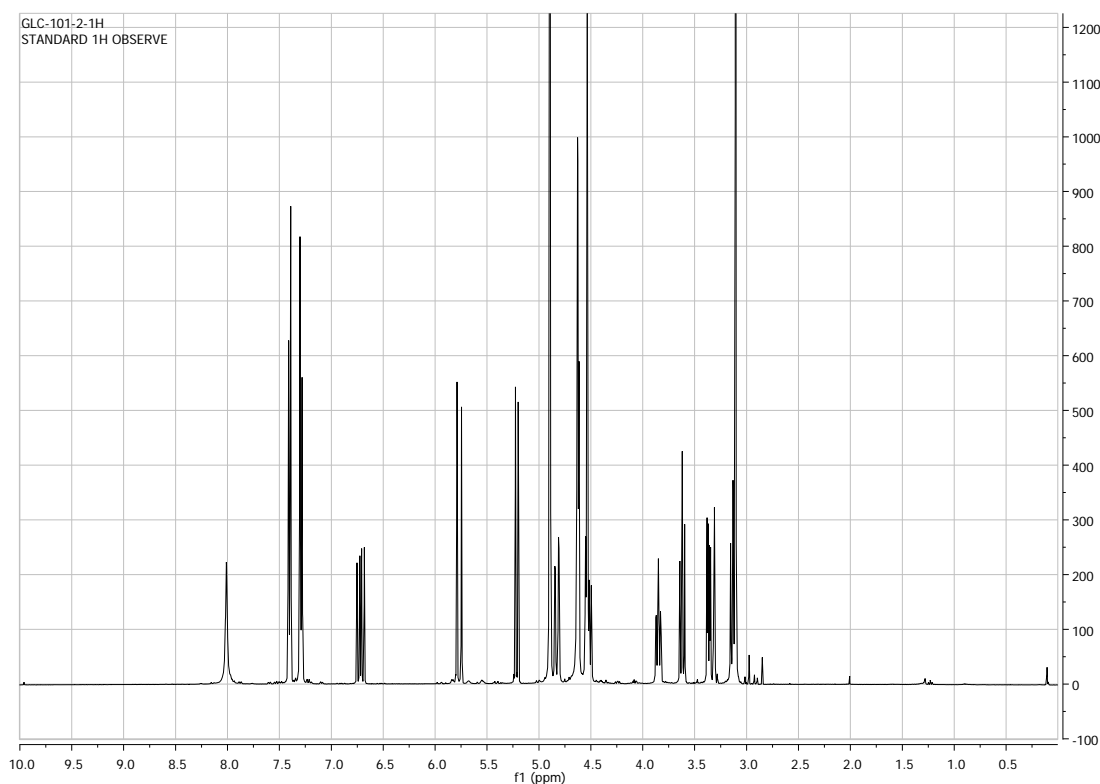


**Figura A.9.** Segundo paso de la síntesis del monómero GLCSt, mediante tratamiento del  $\alpha$ -Me-Gluco-6-OTs para obtener el derivado  $\alpha$ -Me-Gluco-6- $\text{N}_3$ .

Este producto fue disuelto en 156 mL de una mezcla DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) a la que se añadieron sucesivamente éter propargílico de 4-vinilbencilo (1,56 g; 9,86 mmol),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (763 mg; 3,05 mmol) y ascorbato sódico (548 mg; 2,76 mmol). La mezcla fue calentada a 80 °C durante 1 hora. Tras eliminar los disolventes a vacío, el residuo se extrajo en metanol para eliminar sales insolubles. El producto final se purificó mediante una columna de sílice obteniendo 1,22 g (65% de rendimiento).



**Figura A.10.** Tercer paso de la síntesis del monómero GLCSt, mediante una reacción de química click entre el  $\alpha$ -Me-Gluco-6-N<sub>3</sub> y el éter propargílico de 4-vinilbencilo, para obtener el monómero GLCSt.

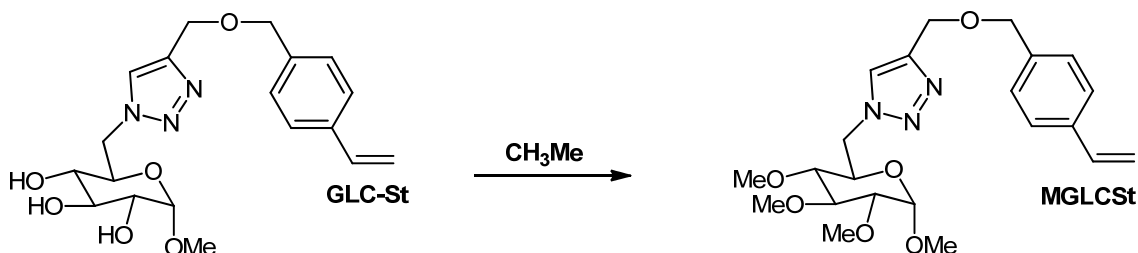


<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.01 (s, 1H, triazol), 7.40 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar), 6.72 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H, vinyl), 5.77 (dd, J = 17.6, 0.9 Hz, 1H, vinyl), 5.21 (dd, J = 10.9, 0.9 Hz, 1H, vinyl), 4.83 (dd, J = 14.2, 2.2 Hz, 1H, H-6a), 4.62 (m, 3H, H-1, ArCH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>), 4.58 – 4.47 (m, 3H, H-6b, ArCH<sub>2</sub>O), 3.90 – 3.80 (m, 1H, H-5), 3.62 (t, J = 9.2 Hz, 1H, H-3), 3.36 (dd, J = 9.7, 3.7 Hz, 1H, H-2), 3.19 – 3.06 (m, 4H, H-4, OCH<sub>3</sub>).

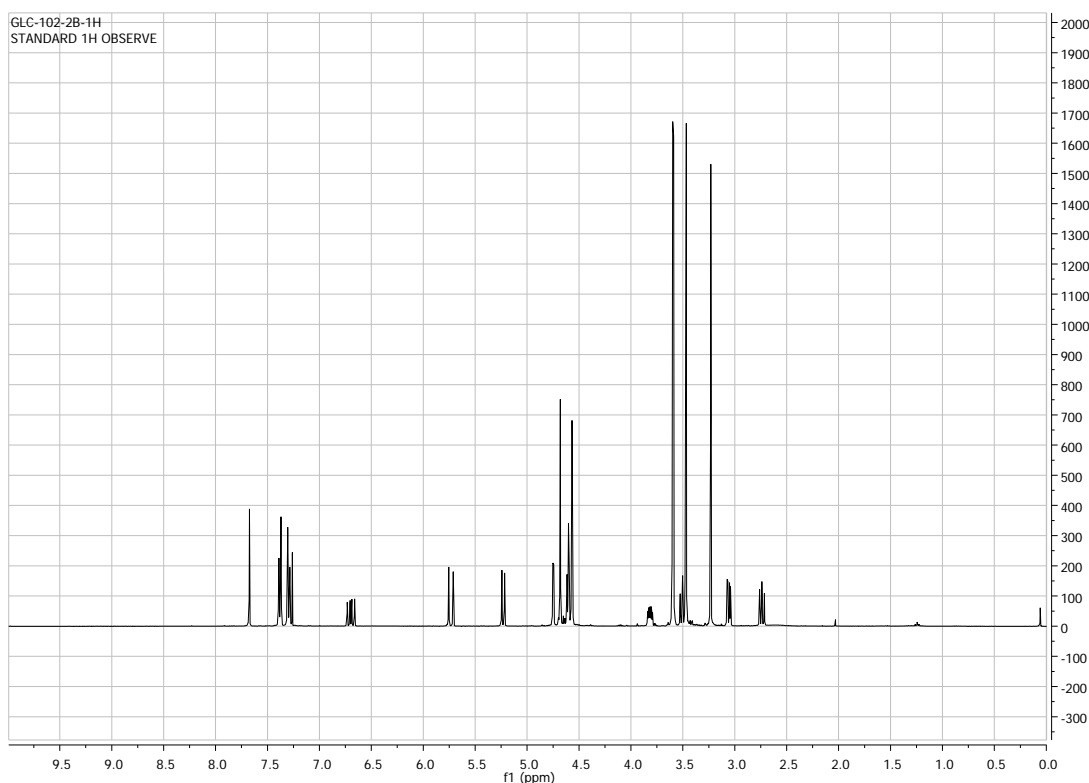
**Figura A.11.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero GLCSt, obtenido a 400 MHz, utilizando CD<sub>3</sub>OD como disolvente.

#### A.4. Síntesis del monómero MGLCSt mediante permetilación de GLCSt

Se disolvieron 534 mg (1,634 mmol) de GLCSt en 8 mL de DMF seca. A esta disolución se le adicionaron 610 mg (15,2 mmol) de NaH (60% en aceite mineral) y 0,52 mL (8,5 mmol) de CH<sub>3</sub>Me. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tiempo suficiente para completar la reacción. El NaH fue eliminado con metanol. La mezcla se diluyó en diclorometano y se lavó repetidamente con agua. La fase orgánica se secó y concentró, purificando el producto final mediante una columna de sílice, obteniendo 463 mg (78%) de producto puro.



**Figura A.12.** Síntesis del monómero MGLCSt mediante permetilación del monómero GLCSt.

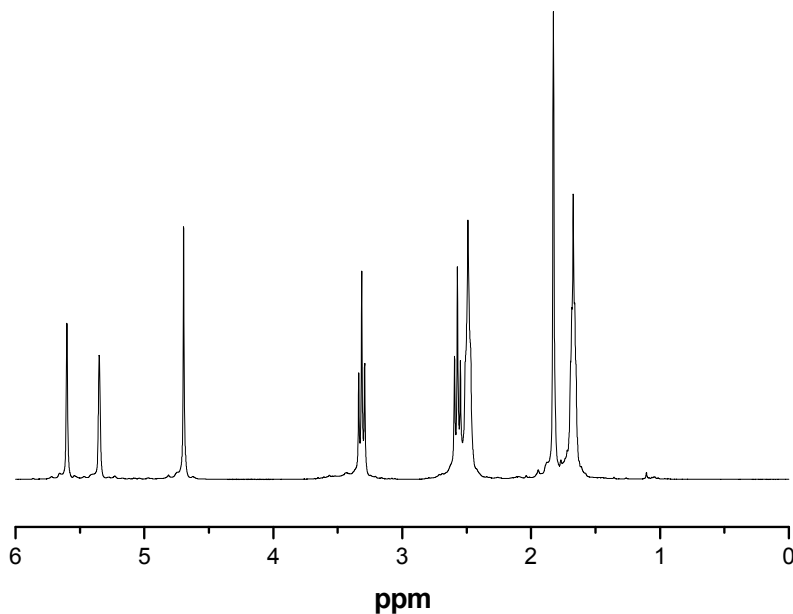


<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.67 (s, 1H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.33 – 7.26 (m, 2H), 6.70 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.74 (ddd, J = 17.6, 6.1, 0.9 Hz, 1H), 5.23 (dd, J = 10.9, 0.8 Hz, 1H), 4.74 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 8.8, 5.6 Hz, 2H), 3.85 – 3.78 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.54 – 3.47 (m, 1H), 3.47 (s, 3H), 3.06 (dd, J = 9.6, 3.6 Hz, 1H).

**Figura A.13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero MGLCSt, obtenido a 400 MHz, utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente.

## B. Espectros de RMN- $^1\text{H}$ de los monómeros sintetizados y caracterizados en este trabajo

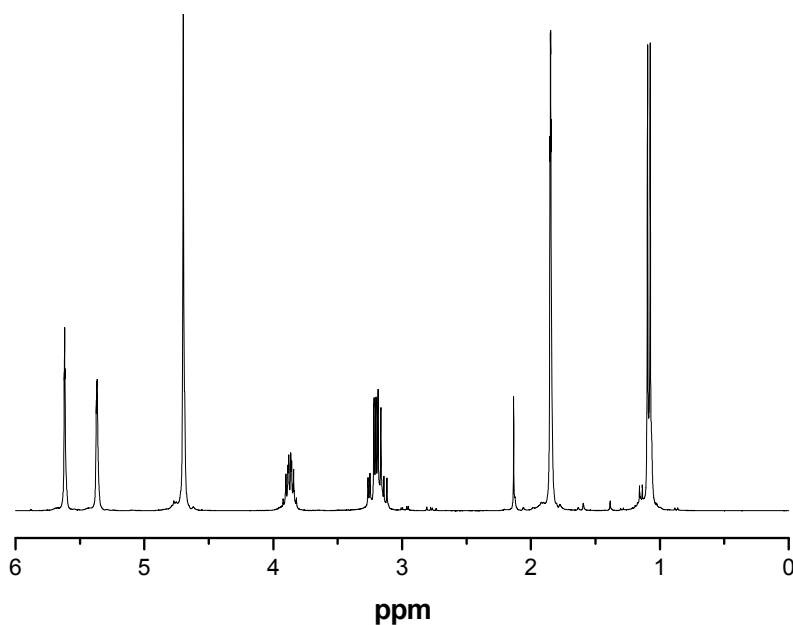
### Metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina (EPA)



RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$ : 5,70 (s, 1H), 5,44 (s, 1H), 3,41 (t, 2H,  $J=6$  Hz), 2,67 (t, 2H,  $J=6$  Hz), 2,58 (m, 4H), 1,92 (s, 3H), 1,77 (m, 4H)

**Figura B.1.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del monómero EPA.

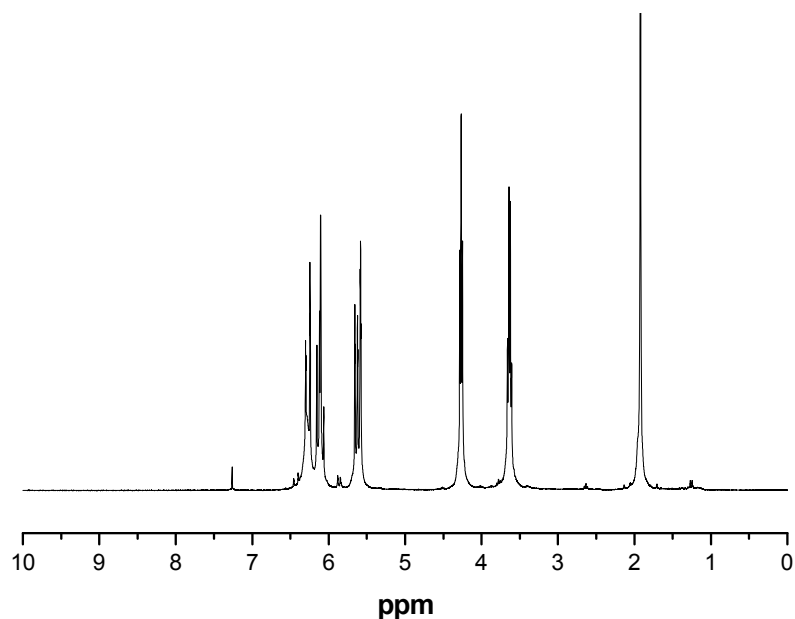
### Metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo) (HPMA)



RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta$ : 5,71 (s, 1H), 5,46 (s, 1H), 3,95 (m, 1H), 3,29 (m, 2H), 1,94 (s, 3H), 1,18 (d, 3H,  $J=6$  Hz).

**Figura B.2.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del monómero HPMA.

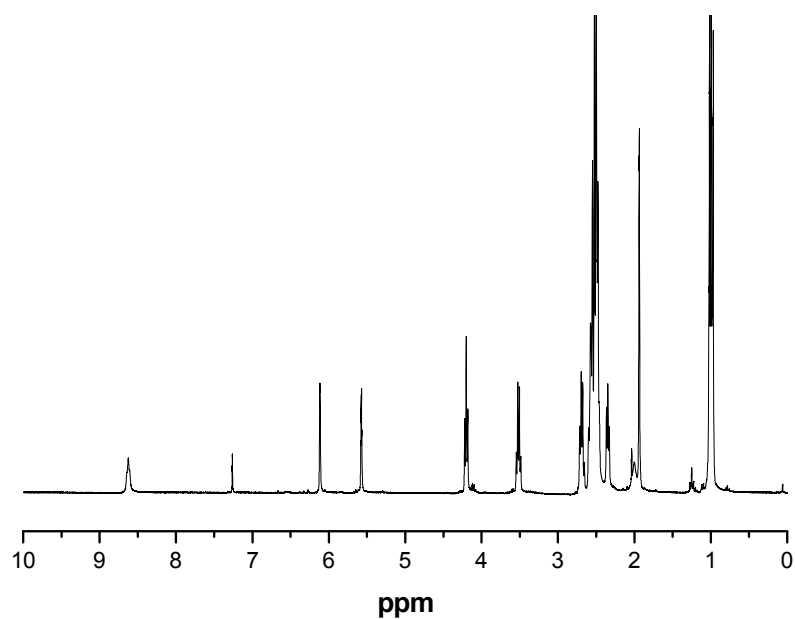
**Metacrilato de 2-(acriloilamino)-etilo (AAEMA)**



RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,26 (d, 1H, J=15 Hz), 6,15-6,06 (m, 2H), 5,66-5,57 (m, 2H), 4,26 (t, 2H, J=5,1 Hz), 3,63 (q, 2H, J=5,1 Hz), 1,92 (s, 3H)

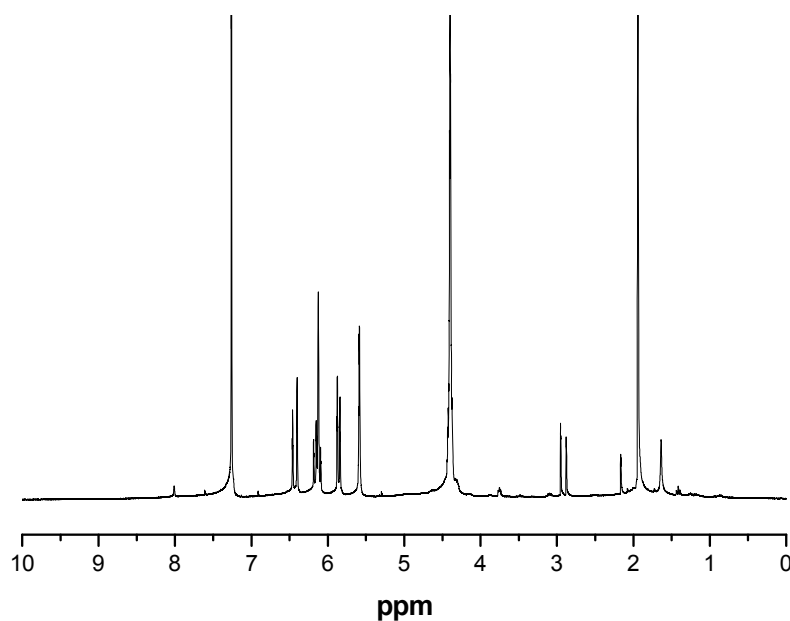
**Figura B.3.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del entrecruzante diacrílico asimétrico AAEMA.

**Metacrilato de 2-(3-(Bis(2-(dietilamino)etil)amino)propanamido)etilo (Ta)**



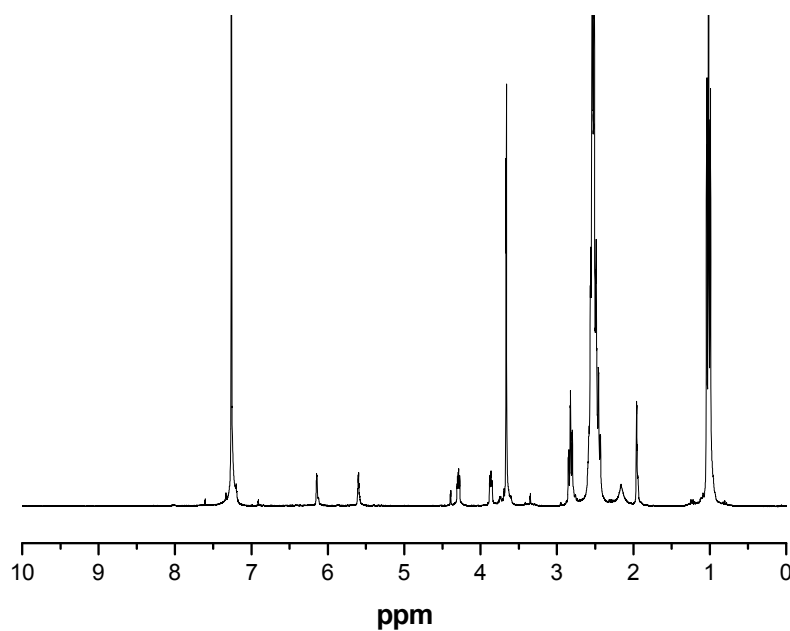
RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,13 (s, 1H), 5,52 (s, 1H), 4,19 (t, 2H, J=6 Hz), 3,51 (q, 2H, J=6 Hz), 2,71-2,65 (m, 2H), 2,59-2,47 (m, 16H), 2,36-2,32 (m, 2H), 1,93 (s, 3H), 1,02-0,96 (m, 12H)

**Figura B.4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero Ta.

**Metacrilato de 2-(acrililoiloxi)-etilo (AOEMA)**

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 6,43 (d, 1H,  $J=9$  Hz), 6,20-6,05 (m, 2H), 5,86 (d, 1H,  $J=12$  Hz), 5,59 (s, 1H), 4,39 (s, 4H), 1,94 (s, 3H)

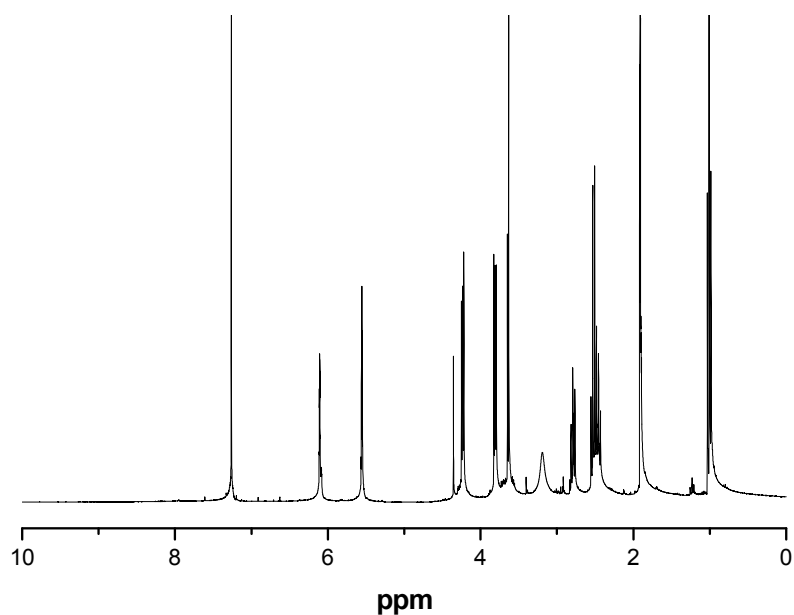
**Figura B.5.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del entrecruzante diacrílico asimétrico AOEMA.

**Metacrilato de 2-((3-(Bis(2-(dietilamino)etil)amino)propanoilo)oxi)etilo (Te)**

RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 6,14 (s, 1H), 5,59 (s, 1H), 4,28 (t, 2H,  $J=4,5$  Hz), 3,86 (t, 2H,  $J=4,5$  Hz), 2,82 (t, 2H,  $J=7,2$  Hz), 2,57-2,43 (m, 18H), 1,95 (s, 3H), 1,04-0,98 (m, 12H).

**Figura B.6.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del monómero Te.

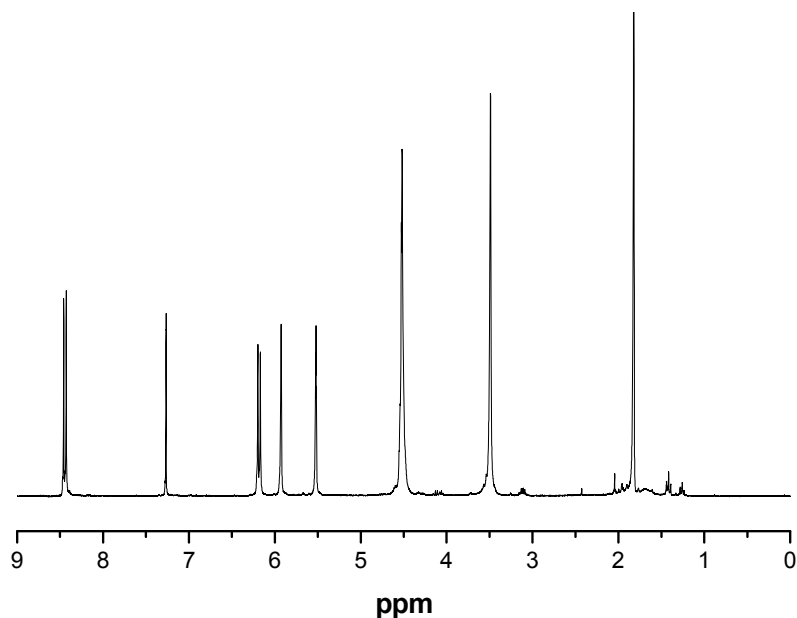
**Metacrilato de 2-((3-(dietilamino)propanoil)oxi)etilo (Te-modelo)**



RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,11 (s, 1H), 5,57 (s, 1H), 4,26 (m, 4H), 2,74-2,69 (m, 2H), 2,59-2,47 (m, 6H), 1,89 (s, 3H), 1,08-0,86 (m, 6H)

**Figura B.7.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero Te-modelo.

**Metacrilato de 2-(metil(7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-4-yl)amino)etilo (NBD-MMA)**



RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ: 6,11 (s, 1H), 5,57 (s, 1H), 4,26 (m, 4H), 2,74-2,69 (m, 2H), 2,59-2,47 (m, 6H), 1,89 (s, 3H), 1,08-0,86 (m, 6H)

**Figura B.8.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del monómero fluorescente NBD-MMA.



## Bibliografia

[1] T. Muhizi, S. Grelier, V. Coma. Synthesis and antibacterial activity of aminodeoxyglucose derivatives against *Listeria innocua* and *Salmonella typhimurium*. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 8770–8775



## **Índice de figuras**



## Índice de figuras

### 1. Introducción general

**Figura 1.1.** Representación esquemática del recorrido y las barreras con las que se encuentran los *polyplexes* utilizados en terapia génica, desde su inyección en el torrente sanguíneo hasta su llegada a la célula. 4

**Figura 1.2.** Estructura química de la polietilenimina (PEI), la poli(L-lisina) (PLL), el quitosano, así como de los dendrímeros derivados de polipropilenimina (PPI) y poliamidoamina (PAMAM). 5

**Figura 1.3.** Estructura química de la metacrilamida de *N*-(2-aminoetil) pirrolidina (EPA). 9

**Figura 1.4.** Representación esquemática de los monómeros acrílicos derivados de la amina dendrónica TEDETA, denominados Ta y Te sintetizados y estudiados en la presente tesis doctoral. 10

**Figura 1.5.** Estructura química de metacrilamida de *N*-(2-hidroxipropilo) (HPMA). 11

**Figura 1.6.** Estructura química de los diferentes monómeros estirénicos derivados de las formas hidroxilada y permetilada de la  $\beta$ -ciclodextrina y la  $\alpha$ -glucosa, sintetizados y caracterizados en este trabajo. 13

**Figura 1.7.** Representación esquemática de la distribución en la cadena polimérica de unidades monoméricas con carga positiva y unidades neutras en copolímeros de bloque (a) y copolímeros estadísticos (b). 14

### 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

**Figura 2.1.** Esquema de la estructura de los monómeros y de la preparación de los copolímeros estudiados en este trabajo. 24

**Figura 2.2.** Representación esquemática de la adición de Michael selectiva de la amina dendrónica TEDETA sobre dos compuestos diacrílicos asimétricos, obteniendo los productos Ta en el caso de que  $X=NH$ , y Te en el caso de que  $X=O$ , siendo este compuesto sensible a la hidrólisis. 25

**Figura 2.3.** Representación esquemática de las unidades repetitivas del poli 26

## Índice de figuras

metacrilato de etilpirrolidina, poli(DMAEM), el polimetacrilato de N,N-dietilaminoetilo, poli(DEAEM), y el polimetacrilato de N,N-dimetilaminoetilo, poli(DMAEM).

<b>Figura 2.4.</b> Etapas de la polimerización radical.	27
<b>Figura 2.5.</b> Representación esquemática de una copolimerización simultánea de dos monómeros y de la formación de una cadena de polímero estadístico.	28
<b>Figura 2.6.</b> Esquema de dos tipos de macrorradicales mostrando las unidades terminal y penúltima usadas en los correspondientes modelos.	29
<b>Figura 2.7.</b> Posibles reacciones de propagación y relaciones de reactividad según el modelo terminal.	29
<b>Figura 2.8.</b> Síntesis de la metacrilamida de <i>N</i> -(2-aminoetil) pirrolidina (EPA).	32
<b>Figura 2.9.</b> Síntesis de la metacrilamida de <i>N</i> -(2-hidroxipropilo) (HPMA).	33
<b>Figura 2.10.</b> Síntesis del entrecruzante diacrílico asimétrico AAEMA.	34
<b>Figura 2.11.</b> Síntesis del monómero metacrílico denominado Ta.	34
<b>Figura 2.12.</b> Síntesis del entrecruzante diacrílico asimétrico AOEMA.	35
<b>Figura 2.13.</b> Síntesis del monómero metacrílico denominado Te.	35
<b>Figura 2.14.</b> Síntesis del monómero metacrílico denominado Te-modelo.	36
<b>Figura 2.15.</b> Ruta sintética usada por el Grupo de Química Orgánica Biológica del IQOG para preparar los monómeros glucosídicos.	38
<b>Figura 2.16.</b> Estructura química de los dos entrecruzantes asimétricos utilizados en este trabajo como precursores de la síntesis de Ta y Te.	39
<b>Figura 2.17.</b> Representación esquemática de la adición de una amina primaria sobre un grupo acrilato, dando lugar a la formación de un producto disustituido.	40
<b>Figura 2.18.</b> a) Representación esquemática de la hidrólisis experimentada	41

por el Ta-modelo en medio acuoso. b) Espectros de  $^1\text{H}$  RMN del Te-modelo y de sus productos de degradación.

<b>Figura 2.19.</b> Estructura química de los diferentes copolímeros poli(EPA-co-HPMA) y poli(Ta-co-HPMA) sintetizados, caracterizados y estudiados en la presente tesis doctoral.	42
<b>Figura 2.20.</b> Espectros de RMN- $^1\text{H}$ del homopolímero EPA <sub>100</sub> y de los copolímeros EPA <sub>50</sub> y EPA <sub>10</sub> .	44
<b>Figura 2.21.</b> Espectros de RMN- $^1\text{H}$ del homopolímero Ta <sub>100</sub> y los copolímeros Ta <sub>46</sub> y Te <sub>46</sub> .	45
<b>Figura 2.22.</b> . Fracción molar instantánea en el copolímero de Ta en función de la conversión para las 3 copolimerizaciones estudiadas en este trabajo.	46
<b>Figura 2.23.</b> a) Esquema del proceso de hidrólisis de Te <sub>46</sub> . b) Espectros representativos de la monitorización <i>in situ</i> de la degradación a pH 8.	50
<b>Figura 2.24.</b> Fracción hidrolizada del resto TEDETA frente al tiempo para diferentes valores de pH.	51
<b>Figura 2.25.</b> Turbidimetría de Ta <sub>46</sub> a pH 9 mostrada como ejemplo.	52
<b>Figura 2.26.</b> Temperaturas de transición (LCSTs) medidas por turbidimetría frente al pH.	52
<b>Figura 2.27.</b> Estructura química de los diferentes copolímeros derivados de $\beta$ -CD y $\alpha$ -glucosa sintetizados y caracterizados en la presente tesis doctoral.	55
<b>Figura 2.28.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del copolímero CDSt <sub>5</sub> .	57
<b>Figura 2.29.</b> Espectros de RMN- $^1\text{H}$ del homopolímero MCDSt <sub>100</sub> y del copolímero MCDSt <sub>5</sub> .	57
<b>Figura 2.30.</b> Espectros de RMN- $^1\text{H}$ de los copolímeros GLCSt <sub>5</sub> y GLCSt <sub>70</sub> .	58
<b>Figura 2.31.</b> Espectros de RMN- $^1\text{H}$ de los copolímeros MGLCSt <sub>5</sub> y MGLCSt <sub>70</sub> .	58
<b>Figura 2.32.</b> Fracción molar instantánea en el copolímero de la unidad	59

## Índice de figuras

estirénica en función de la conversión para las copolimerizaciones estudiadas en este trabajo.

### 3. Complejación con ADN, respuesta celular y transfección

<b>Figura 3.1.</b> Barreras, a nivel celular, que el complejo polímero catiónico-ADN ( <i>polyplex</i> ) debe superar para llevar a cabo el proceso de transfección.	66
<b>Figura 3.2.</b> Síntesis del monómero metacrílico fluorescente NBDM.	71
<b>Figura 3.3.</b> Copolímeros poli(EPA-co-HPMA) a) Tamaño medio de partícula en PBS b) Carga en superficie (potencial $\zeta$ ) en PBS c) Eficiencia de transfección de los <i>polyplexes</i> tras 48 horas de incubación, en comparación con los controles positivos PLL y EPA <sub>100</sub> , en fibroblastos Swiss 3T3.	79
<b>Figura 3.4.</b> Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Triadas más pobladas.	80
<b>Figura 3.5.</b> Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Porcentajes de actividad metabólica (ensayo con Alamar Blue) de los fibroblastos Swiss 3T3.	81
<b>Figura 3.6.</b> Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Representación de la eficiencia de transfección de los 3 copolímeros capaces de complejar ADN (EPA <sub>90</sub> , EPA <sub>70</sub> y EPA <sub>50</sub> ) frente a su actividad metabólica.	82
<b>Figura 3.7.</b> Polímeros dendrónicos. Movilidad electroforética del ADN plasmídico en los complejos polímero/ADN a diferentes relaciones N/P.	83
<b>Figura 3.8.</b> Polímeros dendrónicos. a) Tamaño medio de partícula en agua b) Determinación de la carga en superficie (potencial $\zeta$ ) en agua c) Eficiencia de transfección tras 48 horas de incubación en fibroblastos Swiss 3T3 d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección.	85
<b>Figura 3.9.</b> Polímeros dendrónicos. Triadas más pobladas.	87
<b>Figura 3.10.</b> Polímeros dendrónicos. Representación de la eficiencia de transfección de los diferentes polímeros dendrónicos frente a su viabilidad a las diferentes relaciones N/P estudiadas.	88
<b>Figura 3.11.</b> Representación de la eficiencia de transfección y actividad	90



metabólica o viabilidad celular frente a la proporción molar de HPMA de los sistemas: a) poli(EPA-co-HPMA) b) poli(Ta-co-HPMA)

**Figura 3.12.** Copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt) a) Tamaño medio de partícula en agua b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) en agua c) Eficiencia de transfección tras 48 horas de incubación en fibroblastos Swiss 3T3 d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección. Los controles positivos utilizados son PEI y EPA<sub>100</sub>. 93

**Figura 3.13.** Representación esquemática de secuencias con un 10 y un 20% molar de derivado de CD. 95

**Figura 3.14.** Copolímeros poli(EPA-co-CDSt) y poli(EPA-co-MCDSt) a) Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.11c**). b) Eficiencia de transfección de los polyplexes en células tumorales B16. c) Viabilidad celular de los *polyplexes* en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.11d**). d) Viabilidad celular de los *polyplexes* en Células tumorales B16. 98

**Figura 3.15.** Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) a) Tamaño medio de partícula en agua b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) en agua c) Eficiencia de transfección tras 48 horas de incubación en fibroblastos Swiss 3T3 d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección. Los controles positivos utilizados son PEI y EPA<sub>100</sub>. 100

**Figura 3.16.** Representación esquemática de secuencias con un 10, 20, 35 y 70% molar de derivado de GLCSt. 102

**Figura 3.17.** Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) a) Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.14c**). b) Eficiencia de transfección de los polyplexes en células tumorales B16. c) Viabilidad celular de los *polyplexes* en fibroblastos Swiss 3T3 (**figura 3.14d**). d) Viabilidad celular de los *polyplexes* en Células tumorales B16. 103

**Figura 3.18.** Copolímeros poli(EPA-co-MGLCSt) a) Tamaño medio de partícula en agua b) Determinación de la carga en superficie (potencial  $\zeta$ ) en agua c) Eficiencia de transfección. d) Viabilidad celular de los fibroblastos Swiss 3T3, 48 horas tras la transfección. Los controles positivos utilizados son PEI y EPA<sub>100</sub>. 105

**Figura 3.19.** Representación esquemática de secuencias con un 10, 20, 35 y 107

## Índice de figuras

70% molar de derivado de MGLCSt.

<b>Figura 3.20.</b> Copolímeros poli(EPA-co-GLCSt) a) Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 ( <b>figura 3.17c</b> ). b) Eficiencia de transfección de los polyplexes en células tumorales B16. c) Viabilidad celular de los <i>polyplexes</i> en fibroblastos Swiss 3T3 ( <b>figura 3.17d</b> ). d) Viabilidad celular de los <i>polyplexes</i> en Células tumorales B16.	109
<b>Figura 3.21.</b> Representación esquemática de las diferencias estructurales de los polímeros derivados de (M)CDSt <sub>20</sub> y (M)GLCSt <sub>70</sub> y su posible influencia en su eficiencia el apantallamiento de las cargas positivas del monómero EPA, y por tanto, de su complejación con ADN.	111
<b>Figura 3.22.</b> Tamaño de partícula de los <i>polyplexes</i> en función de la carga molar de anillo glucosídico.	112
<b>Figura 3.23.</b> Porcentaje de viabilidad de los fibroblastos Swiss 3T3 en función de la carga molar de anillo glucosídico.	113
<b>Figura 3.24.</b> Eficiencia de transfección en fibroblastos Swiss 3T3 en función de la carga molar de anillo glucosídico.	114
<b>Figura 3.25.</b> Polímeros glucosídicos. Representación la eficiencia de transfección de los diferentes polímeros frente a su viabilidad en fibroblastos Swiss 3T3 a las diferentes relaciones N/P estudiadas.	115
<b>Figura 3.26.</b> Esquema de la estructura de los monómeros y de la preparación de los copolímeros fluorescentes sintetizados en este ensayo preliminar.	116
<b>Figura 3.27.</b> Micrografías obtenidas 4 horas tras la transfección de fibroblastos Swiss 3T3. a) Derivado fluorescente del polímero MCDSt <sub>10</sub> , relación N/P 2/1. b) Derivado fluorescente del polímero MGLCSt <sub>10</sub> , relación N/P 8/1.	117
<b>Figura 3.28.</b> Micrografías obtenidas 24 horas tras la transfección de fibroblastos Swiss 3T3, con el derivado fluorescente del polímero GLCSt <sub>5</sub> , relación N/P 2/1. Las micrografías fueron realizadas con un microscopio fluorescente, utilizando un nivel de magnificación 10x.	117

**Anexo**

<b>Figura A.1.</b> Primer paso de la síntesis del monómero CDSt. Tosilación de la $\beta$ -ciclodextrina para obtener el derivado monotosilado $\beta$ -ciclodextrina-OTs.	127
<b>Figura A.2.</b> Segundo paso de la síntesis del monómero CDSt. Tratamiento de la $\beta$ -ciclodextrina-OTs con azida sódica, para obtener el derivado $\beta$ -ciclodextrina-N <sub>3</sub> .	128
<b>Figura A.3.</b> Tercer y último paso de la síntesis del monómero CDSt, mediante una reacción de química click entre la $\beta$ -ciclodextrina-N <sub>3</sub> y el éter propargílico de 4-vinilbencilo para obtener el monómero CDSt.	128
<b>Figura A.4.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN del monómero CDSt, obtenido a 400 MHz, utilizando $d_6$ DMSO como disolvente.	129
<b>Figura A.5.</b> Primer paso de la síntesis del monómero MCDSt. Permetilación de la $\beta$ -ciclodextrina-N <sub>3</sub> para obtener el derivado Me- $\beta$ -ciclodextrina-N <sub>3</sub> .	130
<b>Figura A.6.</b> Segundo paso de la síntesis del monómero MCDSt, mediante una reacción de química click entre la Me- $\beta$ -ciclodextrina-N <sub>3</sub> y el éter propargílico de 4-vinilbencilo para obtener el monómero MCDSt.	131
<b>Figura A.7.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN del monómero MCDSt, obtenido a 400 MHz, utilizando CDCl <sub>3</sub> como disolvente.	131
<b>Figura A.8.</b> Primer paso de la síntesis del monómero GLCSt, Tosilación del metil $\alpha$ -D-glucopiranosido para obtener el derivado monotosilado $\alpha$ -Me-Gluco-6-OTs.	132
<b>Figura A.9.</b> Segundo paso de la síntesis del monómero GLCSt, mediante tratamiento del $\alpha$ -Me-Gluco-6-OTs para obtener el derivado $\alpha$ -Me-Gluco-6-N <sub>3</sub> .	132
<b>Figura A.10.</b> Tercer paso de la síntesis del monómero GLCSt, mediante una reacción de química click entre el $\alpha$ -Me-Gluco-6-N <sub>3</sub> y el éter propargílico de 4-vinilbencilo, para obtener el monómero GLCSt.	133
<b>Figura A.11.</b> Espectro de <sup>1</sup> H RMN del monómero GLCSt, obtenido a 400 MHz, utilizando CD <sub>3</sub> OD como disolvente.	133

## Índice de figuras

<b>Figura A.12.</b> Síntesis del monómero MGLCSt mediante permetilación del monómero GLCSt.	134
<b>Figura A.13.</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN del monómero MGLCSt, obtenido a 400 MHz, utilizando $\text{CDCl}_3$ como disolvente.	134
<b>Figura B.1.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del monómero EPA.	135
<b>Figura B.2.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del monómero HPMA.	135
<b>Figura B.3.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del entrecruzante diacrílico asimétrico AAEMA.	136
<b>Figura B.4.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del monómero Ta.	136
<b>Figura B.5.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del entrecruzante diacrílico asimétrico AOEMA.	137
<b>Figura B.6.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del monómero Te.	137
<b>Figura B.7.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del monómero Te-modelo.	138
<b>Figura B.8.</b> Espectro de RMN- $^1\text{H}$ del monómero fluorescente NBD-MMA.	138

## **Índice de tablas**



## Índice de tablas

### 2. Síntesis y caracterización de monómeros y polímeros

<b>Tabla 2.1.</b> Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Fracciones molares de los comonómeros, tanto en alimentación como en el producto final, además de los pesos moleculares (Da) y valor de polidispersidad.	42
<b>Tabla 2.2.</b> Polímeros dendrónicos. Fracciones molares de los comonómeros, tanto en alimentación como en el producto final, además de los pesos moleculares (Da) y valor de polidispersidad. Valores de LCST de cada polímero a pH 8 y pH 9.	42
<b>Tabla 2.3.</b> Copolímeros poli(EPA-co-HPMA). Fracciones molares acumuladas de triadas centradas en EPA y HPMA simuladas por Copol para las diferentes reacciones suponiendo que alcanzan conversión total.	47
<b>Tabla 2.4.</b> Polímeros dendrónicos. Fracciones molares acumuladas de triadas centradas en Ta y HPMA simuladas por Copol para las diferentes reacciones suponiendo que alcanzan conversión total.	48
<b>Tabla 2.5.</b> Fracciones molares de CDSt <sub>z</sub> y MCDSt <sub>z</sub> (siendo Z el tanto por ciento nominal de (M)CDSt) en alimentación y en los copolímeros, pesos moleculares (Da) y polidispersidades para los sistemas EPA-CDSt y EPA-MCDSt.	53
<b>Tabla 2.6.</b> Fracciones molares de GLCSt <sub>z</sub> (siendo Z el tanto por ciento nominal de GLCSt) en alimentación y en los copolímeros, pesos moleculares (Da) y polidispersidades del sistema EPA-GLCSt.	53
<b>Tabla 2.7.</b> Fracciones molares de MGLCSt (siendo Z el tanto por ciento nominal de MGLCSt) en alimentación y en los copolímeros, pesos moleculares (Da) y polidispersidades del sistema EPA-MGLCSt.	54
<b>Tabla 2.8.</b> Polímeros glucosídicos. Fracciones molares acumuladas de triadas centradas en EPA y U-St simuladas por Copol para las diferentes reacciones suponiendo que alcanzan conversión total.	59